

*Protein Engineering* an Cystinknoten-Miniproteinen:  
Generierung von immunregulatorischen Varianten mit  
optimierten Bindungseigenschaften und Gerüststrukturen



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation vorgelegt von

Dipl.-Biol. Franziska Maaß

aus Dresden

Referent:	Prof. Dr. H. Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. S. Neumann
Tag der Einreichung:	18. März 2014
Tag der mündlichen Prüfung:	29. April 2014

Darmstadt 2014

D17

---



"In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt."

Isaac Newton (1643 – 1727)

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Cystinknoten-Miniproteine als Grundgerüst .....	2
1.2	<i>Protein engineering</i> .....	4
1.2.1	Rationales Proteindesign .....	5
1.2.2	Gerichtete Evolution .....	6
1.3	<i>Yeast surface display</i> .....	8
1.4	Die Rolle des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens 4 (CTLA-4) als negatives Regulatormolekül der Immunantwort .....	10
1.4.1	Das Immunsystem .....	10
1.4.2	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) .....	11
1.5	Zielsetzung .....	14
2	Materialien .....	15
2.1	Bakterien-, Hefestämme und verwendete Zelllinien .....	15
2.1.1	Bakterienstämme - <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.1.2	Hefestämme - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
2.1.3	Phagen.....	16
2.1.4	Zelllinien.....	16
2.2	Plasmide .....	16
2.2.1	pCT-Trx-VHH/pCT-SnoaL .....	16
2.2.2	pET-32K.....	17
2.2.3	pEXPR-TEV-H20C-Fc-Srt .....	18
2.3	DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker .....	19
2.3.1	DNA-Längenstandards.....	19
2.3.2	Molekulargewichtsmarker für Proteingelelektrophorese .....	20
2.4	Oligodesoxyribonukleotide .....	21
2.5	Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren.....	22
2.6	Antikörper .....	23
2.7	Chemikalien.....	24
2.8	Sonstige Materialien und Geräte .....	25
2.9	Nährmedien.....	26
2.9.1	<i>Escherichia coli</i> .....	26
2.9.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
2.9.3	Zelllinien.....	27
2.10	Lösungen und Puffer .....	28
2.11	Kits .....	34
3	Methoden.....	35
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden .....	35
3.1.1	Arbeiten mit Bakterien .....	35
3.1.2	Arbeiten mit Phagen.....	35
3.1.3	Phagenproduktion in <i>deepwell</i> Platten .....	36
3.1.4	Bestimmung des Phagentiters.....	36
3.1.5	Arbeiten mit Hefen.....	36

3.1.6	Bestimmung der Zelldichte.....	37
3.1.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.1.8	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
3.1.9	Oberflächenexpression von Proteinen auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Induktion).....	38
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	39
3.2.1	Sterilisation der verwendeten Geräte und Lösungen.....	39
3.2.2	DNA-Fällung mit Ammoniumacetat-Ethanol.....	39
3.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	40
3.2.4	Agarosegelelektrophorese .....	40
3.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	41
3.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR Ansätzen mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) .....	41
3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	41
3.2.7.1	Isolierung analytischer Mengen von Plasmid-DNA mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Kit (Promega) .....	41
3.2.7.2	Isolierung präparativer Mengen von Plasmid-DNA mit dem Pure Yield® Plasmid Midiprep System-Kit (Promega).....	42
3.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
3.2.9	Sucrosedichtegradientenzentrifugation .....	42
3.3	Enzymatische Arbeitsmethoden .....	43
3.3.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	43
3.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	43
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.3.4	Kolonie-PCR.....	45
3.3.4.1	Kolonie-PCR von <i>Escherichia coli</i> .....	45
3.3.4.2	Kolonie-PCR von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
3.3.5	<sup>3</sup> CARD-System.....	46
3.3.5.1	Oxidation von Proteinen mittels Natriumperiodat .....	46
3.3.5.2	Generierung des GOX-CTLA-4-Konjugats.....	47
3.3.5.3	Biotinyramidmarkierung von Phagen mittels <sup>3</sup> CARD System .....	47
3.3.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	48
3.3.7	Phagen-ELISA .....	49
3.3.8	Enzymatischer Aktivitätstest von Oxidasen mittels ABTS .....	49
3.4	Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	50
3.4.1	Expression von Miniproteinen in <i>Escherichia coli</i> .....	50
3.4.2	Zellaufschluss mittels French-Press.....	50
3.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
3.4.4	Dialyse von Proteinen.....	52
3.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels photometrischer Messung ..	52
3.4.6	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen .....	53
3.4.6.1	Biotinylierung von Proteinen.....	53
3.4.6.2	FITC-Markierung von Proteinen .....	53
3.4.7	Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) .....	54
3.4.8	Oxidative Faltung der synthetisierten Miniproteinvarianten .....	54
3.4.9	Chromatographie .....	55
3.4.9.1	Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography (IMAC) .....	55
3.4.9.2	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) .....	55
3.4.9.3	Gelfiltrationschromatographie (GFC) .....	56



3.4.9.4	Protein A Affinitätschromatographie .....	56
3.4.10	Proteinanalyse durch <i>Electrospray-Ionisation Mass Spectrometry</i> (ESI-MS) .....	57
3.4.11	Lagerung von Proteinen .....	57
3.4.12	Bestimmung von Bindungseigenschaften mittels <i>Bio-Layer Interferometry</i> (BLI) Messungen.....	58
3.5	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	59
3.5.1	Immunfluoreszenzmarkierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
3.5.2	Markierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit dem Zielprotein.....	59
3.5.3	Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	60
3.5.4	Immunfluoreszenzmarkierung von CHO-K1-Zellen.....	60
4	Ergebnisse und Diskussion.....	62
4.1	Generierung und Charakterisierung der kombinatorischen Miniprotein-Bibliothek auf Basis von oMCoTI-II.....	62
4.1.1	Design der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek .....	63
4.1.2	Generierung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek mittels homologer Rekombination .....	64
4.1.2.1	Produktion und Reinigung des pCT-Vektors .....	64
4.1.2.2	Erstellung der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek .....	66
4.1.3	Validierung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek via Durchmusterung auf Trypsin.....	67
4.1.3.1	Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf Trypsin .....	67
4.1.3.2	Charakterisierung der Trypsin-bindenden oMCoTI(MCopt)-Varianten.....	69
4.1.4	Diskussion der Ergebnisse .....	71
4.2	Isolierung und Charakterisierung neuer Bindemoleküle des humanen zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) auf Basis von oMCoTI-II.....	73
4.2.1	Durchmusterung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 via Oberflächenpräsentation auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	73
4.2.1.1	Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 mittels <i>yeast display</i> .....	73
4.2.1.2	Bindungsstudie und Sequenzierung der CTLA-4-bindenden Miniproteinvarianten .....	75
4.2.2	Durchmusterung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Phagenbibliothek auf CTLA-4 via <sup>3</sup> CARD.....	78
4.2.2.1	Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 mittels <sup>3</sup> CARD .....	78
4.2.2.2	Bindungsstudien und Sequenzierung der isolierten Miniproteinvarianten.....	81
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse .....	82
4.3	Synthese und Charakterisierung der Miniproteinvariante MC-CT-010 .....	86
4.3.1	Chemische Synthese, Faltung und Reinigung von MC-CT-010 .....	86
4.3.2	Biochemische Charakterisierung von MC-CT-010 .....	87
4.3.2.1	Bestimmung der Bindungsaffinität von MC-CT-010.....	87
4.3.2.2	Bindungsstudien auf CTLA-4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen .....	88
4.3.2.3	Bindungsstudien auf CTLA-4-präsentierenden Hefezellen.....	91
4.3.3	Diskussion der Ergebnisse .....	93
4.4	Strategien zur Oligomerisierung von Miniproteinen.....	95
4.4.1	Generierung und Durchmusterung von dimerischen Miniprotein-Bibliotheken auf CTLA-4 via Oberflächenpräsentation auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	95
4.4.1.1	Erstellung und Selektion der dimerischen Bibliothek I.....	97
4.4.1.2	Erstellung und Selektion der dimerischen Bibliothek II.....	103
4.4.2	Chemische Dimerisierung des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010 ..	111

---

4.4.3	Oligomerisierung des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010 <i>via</i> NeutrAvidin .....	112
4.4.4	Oligomerisierung des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010 über rekombinante Fusion an einen humanen Fc-Teil .....	115
4.4.5	Diskussion der Ergebnisse .....	123
4.5	Funktionelle Analyse der isolierten Miniproteinvarianten.....	126
4.5.1	Diskussion der Ergebnisse .....	128
5	Zusammenfassung .....	129
6	Literaturverzeichnis .....	131
7	Abkürzungsverzeichnis .....	145
8	Danksagung.....	148
9	Erklärungen.....	149
9.1	Erklärung.....	149
9.2	Erklärung.....	149
10	Publikationen .....	150
11	Lebenslauf .....	151

---

## 1 Einleitung

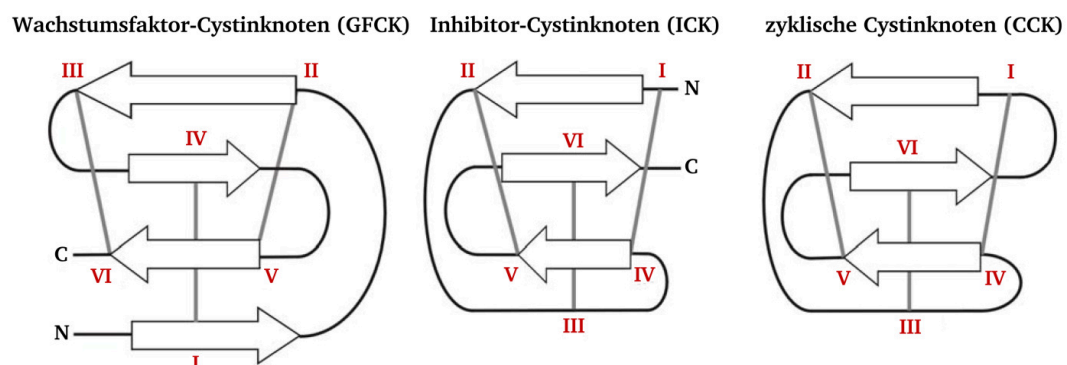
---

Im Jahre 1986 wurde der erste monoklonale Antikörper, namens Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3), zur Minimierung von immunologisch ausgelösten Abstoßungsreaktionen von humanem Transplantationsgewebe zugelassen<sup>1</sup> und ebnete damit den Weg für zukünftige Therapieansätze. Immunglobuline wurden die zunehmend wichtigste Klasse von Bindemolekülen in der biomedizinischen Anwendung. Seither sind bereits 28 monoklonale Antikörper auf dem therapeutischen US- und EU-Markt (Stand: 2011). Ende Juni 2011 befanden sich weitere 1064 Antikörper in der klinischen Phase, wovon 164 in der klinischen Phase III erprobt wurden<sup>2</sup>. Durch ihre Generierung *in vivo* über das natürliche Immunsystem und *in vitro* mittels rekombinanter Expression gibt es ein breites Repertoire an spezifischen und affinen Antikörpern. Jedoch sind Antikörper auch bestimmten Limitierungen ausgesetzt, die ihre therapeutischen Anwendungen einschränken<sup>3</sup>. Beispielsweise ist ihre Herstellung durch ihre molekulare Architektur mit komplexen Glykosylierungsmustern oftmals teurer als die Synthese von Peptiden oder kleinen Molekülen<sup>4</sup>. Desweiteren kann die Größe dieser bivalenten Multidomänenproteine hinderlich beim Erreichen des Zielmoleküls sein<sup>5</sup>, so dass die aktuelle Forschung an der Minimierung von Antikörpern interessiert ist. Verschiedene Antikörper-Fragmente, wie *antigen-binding fragments* (F<sub>ab</sub>), *variable fragments of a heavy chain antibody* (VHH) oder *single-chain variable fragments* (scvF) werden durch *protein engineering* zu spezifischen sowie affinen Bindemolekülen modifiziert und zeigen eine verbesserte Pharmakokinetik im Vergleich zum parentalen Antikörper<sup>6, 7</sup>. Dabei ist nicht außer Acht zu lassen, dass die hoch-affinen monovalenten Bindemoleküle im vaskulären System und im Körpergewebe keinem Gleichgewicht ausgesetzt sind, was zu einer schnelleren Dissoziationsrate führen kann<sup>6</sup>. Deshalb ist es notwendig multivalente Moleküle zu entwickeln, die einen signifikanten Anstieg an funktioneller Affinität, genannt Avidität, und somit eine langsamere Dissoziationsrate zeigen. Hierbei orientiert sich die Biotechnologie an dem natürlichen Immunsystem, welches Immunglobuline generiert, die gleichzeitig zwei (IgG), vier (IgA) oder zehn (IgM) Paratope präsentieren. Die Bindung eines multivalenten Immunglobulins an einen Liganden, welcher mehrere identische Epitope trägt, führt zu einem Aviditätseffekt, der um ein vielfaches stärker ist als die Affinität einer einzelnen Bindung<sup>8</sup>. Es ist möglich, dass eine multivalente Bindung zu einer Aktivierung von Zellsignalwegen führt, die eine neue therapeutische Effizienz mit sich bringen kann<sup>9</sup>. Desweiteren wurde gezeigt, dass durch eine kovalente Dimerisierung ein potenzieller Antagonist eines Induktors zu einem Agonisten generiert werden kann<sup>10</sup>. Mehrere Publikationen postulierten die Entwicklung von

verschiedenen, nicht-immunglobulinen Bindemolekülen wie Avimere<sup>11</sup>, Anticaline<sup>12</sup> oder DARPins<sup>13</sup> über *protein engineering*. Die Isolierung solcher Proteine wird in den meisten Fällen durch die Herstellung von Variantenbibliotheken mit Hilfe von *display*-Methoden (*yeast surface display*, *phage display*, etc.) und deren Durchmusterung *via* Hochdurchsatzverfahren (*high-throughput-screening*) realisiert. Da die aktuelle Forschung zunehmend auf die Entwicklung von kleinen, nicht-immunglobulinen Molekülen mit neuartigen und affinen Bindungsspezifitäten fokussiert ist, könnte die Klasse der Cystinknoten-Miniproteine (Kapitel 1.1) eine attraktive Alternative sein.

## 1.1 Cystinknoten-Miniproteine als Grundgerüst

Cystinknoten sind eine faszinierende Molekülklasse zur Entwicklung von neuen Peptid-basierten Pharmazeutika. Die Familie der Cystinknoten ist in einer Vielzahl von Organismen wie Pflanzen, Arthropoden, Pilzen, Mollusken, Schwämmen und Vertebraten vertreten<sup>14, 15</sup> und lässt sich topologisch in drei verschiedene Gruppen, wie in Abb. 1.1 dargestellt, einteilen.

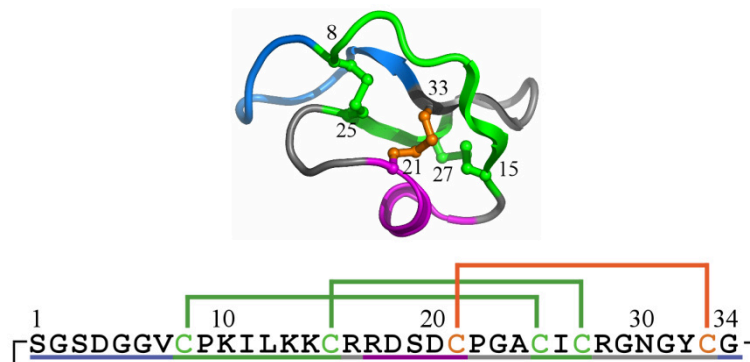


**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Topologie der drei verschiedenen Gruppen von Cystinknoten-Miniproteinen den Wachstumsfaktor-, Inhibitor- (ICK) und zyklischen Cystinknoten (CCK). Die Cysteine sind N-terminal startend von I bis VI in Rot illustriert und die β-Faltblatt Stränge sind als Pfeile dargestellt. Modifiziert nach Schmoldt, 2005<sup>16</sup>.

Es gibt zum einen die Gruppe der Wachstumsfaktor-Cystinknoten (GFCKs, *growth factor cystine knots*)<sup>17</sup>, zu denen beispielsweise die Proteine NGF<sup>18</sup>, PDGF-BB<sup>19</sup> und TGF-β2<sup>20</sup> gehören. Zum anderen gibt es die Gruppe der Inhibitor-Cystinknoten (ICKs, *inhibitor cystine knots*)<sup>21</sup> und der zyklischen Cystinknoten (CCKs, *cyclic cystine knots*)<sup>22</sup>. Zyklische Cystinknoten grenzen sich durch einen Ringschluss, bei dem N- und C-Terminus über eine zusätzliche Peptidbindung verknüpft sind, von Inhibitor- und Wachstumsfaktoren-

Cystinknoten ab<sup>23</sup>. Dagegen unterscheiden sich Wachstumsfaktoren-Cystinknoten von inhibitorischen und zyklischen Cystinknoten durch ihre Größe und geringere Stabilität<sup>24</sup>, so dass sie in dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden.

Cystinknoten-Miniproteine, auch als *knottins*<sup>25</sup> bekannt, zeichnen sich durch eine geringe Größe (30 bis 40 Aminosäuren lang) und eine definierte dreidimensionale Struktur aus<sup>26</sup>. Diese charakteristische Struktur enthält drei kurze antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind, und drei Disulfidbrücken, die durch die Verknüpfung von sechs Cysteinen entstehen<sup>15, 26</sup>. Das Peptidrückgrat wird dabei über zwei Disulfidbrücken Cys<sup>I</sup>-Cys<sup>IV</sup> und Cys<sup>II</sup>-Cys<sup>V</sup> miteinander vernetzt und von einer dritten Disulfidbrücke Cys<sup>III</sup>-Cys<sup>VI</sup> durchspannt. Dieses Strukturmotiv, welches ebenfalls durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird<sup>27, 28</sup>, verleiht den *knottins* eine hohe thermische, proteolytische und chemische Stabilität<sup>29-34</sup>. Die bisher isolierten Cystinknoten-Peptide zeigen die unterschiedlichsten Bioaktivitäten. So gibt es neben den typischen Protease-Inhibitoren<sup>35-37</sup> Miniproteine, die eine anti-HIV<sup>38</sup>, antimikrobielle<sup>39</sup>, insektizide<sup>40</sup> oder hämolytische<sup>41</sup> Aktivität aufweisen sowie Ionenkanäle blockieren können<sup>42</sup>. Speziell das Miniprotein MCoTI-II ist ein aus dem Kürbisgewächs *Momordica cochinchinensis* isolierter Trypsin-Inhibitor, dessen Inhibitionskonstante im subnanomolaren Bereich liegt<sup>27, 43, 44</sup>. Wie in Abb. 1.2 dargestellt, liegt MCoTI-II *in vivo* als 34 Aminosäuren langes, zyklisches Molekül vor und ist synthetisch sowie rekombinant zugänglich.



**Abb. 1.2:** Dreidimensionale Darstellung des *head-to-tail* zyklisierten Trypsin-Inhibitors MCoTI-II. Der *head-to-tail* Linker ist in Blau, der Cystinknoten ist in Grün (zyklisiertes Peptidrückgrat) und Orange (durchspannende Disulfidbrücke) illustriert. Cystein-Reste sind durchnummeriert. Die  $\beta$ -Faltblätter sind als flache Pfeile und die  $3_{10}$ -Helix in Magenta dargestellt. Darunter ist entsprechend die Sequenz des Proteins mit den Disulfidbrücken und dem *head-to-tail* Linker dargestellt. Modifiziert nach Heitz *et al.* 2008<sup>32</sup>.

---

Eine Herstellung *via* Festphasen-Peptidsynthese<sup>24, 36, 45</sup> und anschließender oxidativer Faltung sowie eine Expression in Bakterien<sup>46, 47</sup> oder Hefen<sup>48</sup> ist möglich. Aufgrund der definierten dreidimensionalen Struktur, der außergewöhnlichen Stabilität und der postulierten oralen Verfügbarkeit<sup>49, 50</sup> scheinen Cystinknoten-Miniproteine für eine Anwendung als Grundgerüst (*scaffold*) für die Entwicklung neufunktionalisierter Bindemoleküle über *protein engineering* (Kapitel 1.2) prädestiniert zu sein. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von Schleifenlängen sowie der Austausch von Aminosäuren in Miniproteinen zu neuartigen Bindeeigenschaften ohne Struktur- oder Funktionsverlust führt<sup>51-53</sup>. Somit wurden über dieses Verfahren basierend auf MCoTI-II beispielsweise neue Inhibitoren gegen die FMDV 3C-Protease<sup>54</sup>, die Leukozyten Elastase<sup>55</sup> und die humane Mastzelltryptase<sup>56</sup> isoliert. Außerdem konnten weitere Cystinknoten-basierte Bindemoleküle für die biomedizinische Anwendung isoliert, ihre schnelle Verteilung im lebenden Organismus sowie ihre Funktion über verschiedene Studien *via* PET (*positron emission tomography*), SPECT (*single-photon emission computed tomography*) und NIRF (*near-infrared fluorescence*) belegt werden<sup>57-60</sup>. Desweiteren wurde über die Fusion eines Cystinknoten-Miniproteins an ein Antikörper-Fc-Fragment eine Verlängerung der Halbwertszeit ohne Funktionsverlust erzielt<sup>61</sup>.

## 1.2 *Protein engineering*

Die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Grundlage aller biologischen Prozesse in Zellen und Organismen. Das Verständnis sowie die Manipulation dieser molekularen Erkennung ist daher ein wichtiges Feld in der biotechnologischen Forschung im Hinblick auf moderne therapeutische Anwendungen<sup>62</sup>. Die Modifikation von Proteinen unter Verwendung der heutigen Techniken zur Manipulation des genetischen Codes nennt sich *protein engineering*. Diese Methode ist ein Prozess zur Entwicklung von alternativen sowie nützlichen Proteinen. Um verbesserte oder neuartige Funktionalitäten zu entwickeln, wird das *protein engineering* genutzt, um in vorhandene Molekülstrukturen gezielt oder zufällig neue Eigenschaften einzubringen<sup>63</sup>. *Protein engineering* verfolgt zwei generelle Strategien, zum einen das rationale Proteindesign und zum anderen die gerichtete Evolution<sup>64</sup>, auf die in den folgenden zwei Kapiteln näher eingegangen wird.

---

### 1.2.1 Rationales Proteindesign

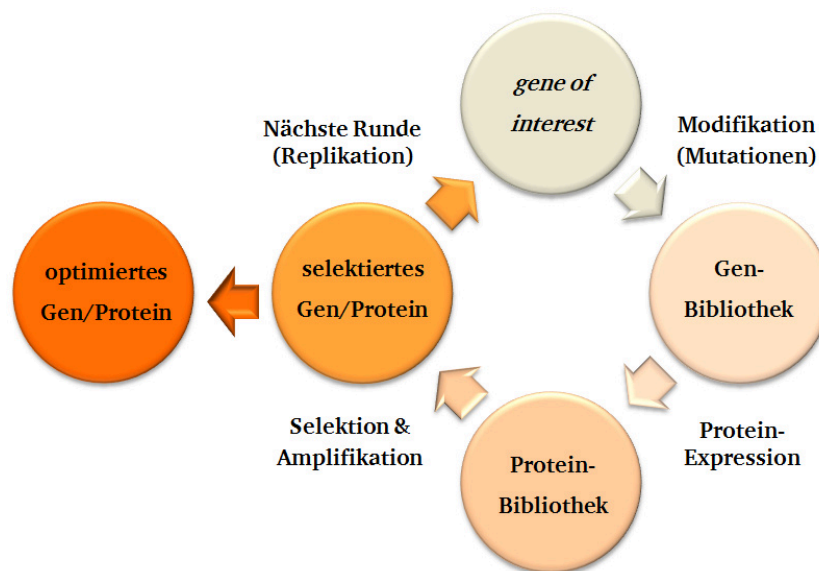
Für das rationale Proteindesign wird detailliertes Wissen über Struktur und Funktion des ausgewählten Proteins benötigt, um die gewünschten Veränderungen einzuführen. Die strukturelle Aufklärung eines Proteins kann dabei durch NMR-Spektroskopie oder auch durch Röntgenstrukturanalyse erfolgen<sup>65</sup>. Durch eine anschließende computergestützte Analyse des Proteins, welche die Modellierung, Energieoptimierung und bei Enzymen auch die Berechnung des Substrat-*dockings* berücksichtigt<sup>66</sup>, können gezielt Aminosäurereste ausgewählt und durch Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen auf DNA-Ebene spezifisch modifiziert werden<sup>67</sup>, um schon bestehende Eigenschaften zu erweitern oder neue Funktionalitäten zu generieren. Diese neu generierten Proteine können dann experimentell auf die gewünschten Eigenschaften untersucht werden. Nachteilig am rationalen Proteindesign ist, dass oft nur eine überschaubare Anzahl an Kandidaten erzeugt und charakterisiert werden kann. Außerdem kann die Verbesserung einer gewünschten Eigenschaft zuweilen zur Verschlechterung einer anderen notwendigen Eigenschaft führen<sup>68</sup>. Multiple Modifikationen können allerdings einen unvorhergesehenen Einfluss auf die korrekte Faltung sowie Funktion des Proteins haben<sup>69</sup>, was dazu führen kann, dass sich die dreidimensionale Struktur des Proteins nicht ausbildet und es somit zu einem vollständigen Aktivitätsverlust kommt. Beim *de novo* Proteindesign wird das komplette Protein *via* Computer entworfen, was jedoch einen enormen Rechenaufwand bedeutet und durch die benötigten Algorithmen zur Berechnung der Energieminimierung limitiert wird<sup>70</sup>.

Beispielsweise wird rationales Proteindesign zur Änderung enzymatischer Aktivitäten oder auch zur Entwicklung von Inhibitoren verwendet. Baker und Kollegen konnten mittels *de novo* Proteindesign Enzyme für die Retro-Aldol-<sup>71</sup> und Diels-Alder-Reaktionen<sup>66</sup> entwickeln. Bei der Xylose Reduktase aus *Candida boidinii* konnte die Cofaktor-Spezifität von NADPH auf NADH verändert werden<sup>72</sup>. Peptid-basierte HIV-Inhibitoren wurden ebenfalls über Computergestütztes Design generiert und konnten ihre inhibitorische Wirkung in einem zellbasierten Assay verifizieren<sup>73</sup>. Im *sunflower trypsin inhibitor-I* (SFTI-1) aus der Sonnenblume *Helianthus annuus* wurde die Disulfidbrücke durch ein 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole ersetzt, wodurch die Redoxstabilität gesteigert werden konnte<sup>74, 75</sup>. Durch strukturbasiertes Design konnten gegen die humane Serinprotease Matriptase-1 neuartige SFTI-1- sowie MCoTI-II-basierende Inhibitoren mit nano- bis picomolaren Inhibitionskonstanten erzeugt werden<sup>37, 76</sup>.



### 1.2.2 Gerichtete Evolution

Die gerichtete Evolution (*directed evolution*) zur Optimierung und Verbesserung von Proteinen orientiert sich an der natürlichen Selektion. Dabei führt das Nachahmen des evolutiven Selektionsprozesses durch die Kombination verschiedener molekularbiologische und biochemische Methoden zur Isolierung von neuartigen Molekülen<sup>77</sup>. Im Gegensatz zum rationalen Proteindesign sind hier keine Vorkenntnisse über die Struktur oder genaue Funktion eines Proteins notwendig<sup>68</sup>. Das Gen eines gewünschten Proteins wird durch Zufallsmutagenese modifiziert<sup>78, 79</sup>, wobei die zufallsbasierten Mutationen über verschiedenste Methoden, wie *error prone* PCR<sup>80</sup>, *DNA-shuffling*<sup>81</sup>, randomisierte Oligonukleotide<sup>82-84</sup> oder auch bestimmte Mutatorstämme<sup>85</sup> eingebracht werden können. Desweiteren wird beim evolutiven Proteindesign eine möglichst große Anzahl an unterschiedlichen Proteinvarianten, sogenannte Bibliotheken, generiert. Diese Variantenbibliotheken werden mit geeigneten Hochdurchsatzverfahren nach Proteinen mit gewünschten Eigenschaften durchmustert<sup>86, 87</sup>. Die so selektierten Proteinvarianten können in weiteren Selektionsrunden eingesetzt werden, bis Proteine mit gewünschter Funktionalität isoliert werden. Der generelle Ablauf der gerichteten Evolution ist in Abb. 1.3 zusammengefasst.



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung zum generellen Ablauf des evolutiven Proteindesigns. Der Startpunkt ist ein natives Gen eines Proteins von Interesse, in welches zufällige Mutationen eingebracht werden. Anschließend erfolgen die Expression der erzeugten Protein-Variantenbibliothek und ihre Durchmusterung auf gewünschte Eigenschaften. Der Selektionszyklus kann beliebig wiederholt werden, bis die Anreicherung von Varianten mit gewünschter Funktion erfolgreich war.



---

Eine der ersten Anwendungen dieses Verfahrens führte zu einem modifizierten Elastase-Inhibitor<sup>88</sup>. Außerdem konnten enantioselektive Mutanten der Esterase (EstA) aus *Pseudomonas aeruginosa* generiert werden<sup>89</sup>. Desweiteren konnten *single chain antibody fragments* (scFvs) mit einer verbesserten Bindungsaffinität<sup>90</sup> und Cytochrom-c-Peroxidase<sup>91</sup> sowie Endonuklease I-SecI mit veränderten Substratspezifitäten<sup>92</sup> gewonnen werden. Das evolutive Proteindesign wurde ebenfalls erfolgreich für die Klasse der Cystinknoten-Miniproteine angewandt. Hierfür wurden einzelne Schleifen des Trypsin-Inhibitors EETI-II modifiziert, um Konsensussequenzen für die Inhibition von Trypsin<sup>51</sup> und die Variabilität des GPNG  $\beta$ -turns zu identifizieren<sup>93</sup>. Außerdem wurde in Min-23, einer verkürzten Variante von EETI-II, eine Schleife randomisiert und es wurden erfolgreich Bindermoleküle isoliert, die unterschiedliche Zielmoleküle wie ein mitochondriales Membranprotein Tom70, ein Malaria Antigen AMA-1 und das HIV Virus Protein Nef adressieren<sup>94</sup>.

Unabdingbar für die Durchführbarkeit des evolutiven Proteindesigns ist die Genotyp-Phänotyp-Kopplung, um nach der Durchmusterung der Variantenbibliotheken die genetische Information der selektierten Proteine isolieren zu können. Zur Oberflächenpräsentation von Proteinvarianten sowie zur Durchmusterung von kombinatorischen Proteinbibliotheken gibt es verschiedene Methoden, die meist auf sich selbst replizierenden Einheiten, wie Bakterien oder Hefen, basieren. Phagen finden ebenfalls Verwendung, jedoch sind diese nicht selbst zur Replikation fähig. Die zellbasierten Verfahren beinhalten *phage display*<sup>95</sup>, *bacterial display*<sup>96, 97</sup> sowie *yeast surface display*<sup>98</sup> und zu den *in vitro* Methoden gehören *ribosomal display*<sup>99, 100</sup> sowie *mRNA-display*<sup>101</sup>. Bei den *in vitro* Verfahren können Bibliotheken mit einer hohen Diversität (bis zu  $10^{14}$ ) erzeugt werden<sup>102</sup>, jedoch muss meist mit Wasser-in-Öl-Emulsionen gearbeitet werden, um eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung sicherzustellen<sup>103</sup>. Die bestehende Hydrolyse- und Nuklease-Empfindlichkeit der eingesetzten mRNA können hierbei zum Nachteil werden. Eine der ersten Techniken zur Oberflächenpräsentation von Proteinen stellt das *phage display* dar<sup>104</sup>. Die genetische Information des zu präsentierenden Proteins wird dazu an ein Gen für die Phagenhülle fusioniert, so dass durch die Expression des Fusionsgens das zu untersuchende Protein auf der Phagenoberfläche lokalisiert wird. Für dieses Verfahren kommen sogenannte Phagemide zur Anwendung<sup>105</sup> und meist werden dafür die Hüllproteine pIII sowie pVIII verwendet<sup>106</sup>. Bei der Methode des *bacterial display* wird die genetische Information des zu präsentierenden Proteins an ein Gen, das für ein Transporter-Protein kodiert, fusioniert, so dass der Transport und die Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche gewährleistet sind. Hierfür kommen verschiedene zelleigene Proteine wie LamB<sup>107</sup>, PhoE<sup>108</sup> oder OmpA<sup>109</sup> zum Einsatz. Das Membranprotein Intimin, welches ein

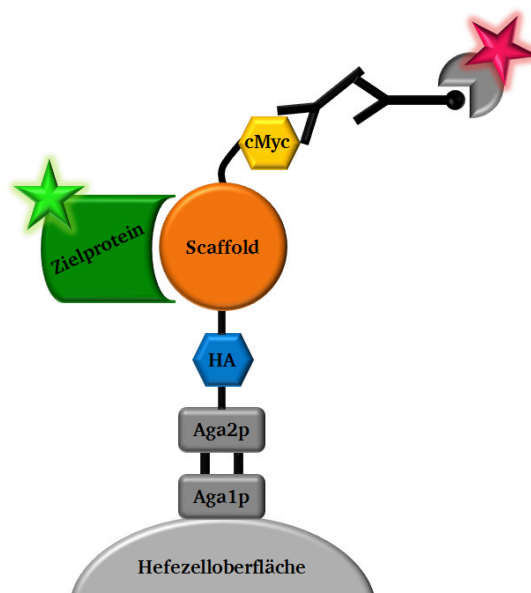
---

Pathogenitätsfaktor aus dem EHEC *E. coli* ist, wurde ebenfalls in verkürzter Form zur Oberflächenpräsentation von verschiedenen Proteinen verwendet<sup>51, 110, 111</sup>. Beide Verfahren können Limitierungen in Faltung, Transport sowie Toxizität der jeweiligen Proteinvarianten aufweisen, was zum Verlust der Bibliotheksdiversität führen kann, die durch die Transformationseffizienz ( $10^{10}$  bis  $10^{11}$ ) von *E. coli* zusätzlich eingeschränkt ist. Da das *yeast surface display* Verfahren einen zentralen Aspekt dieser vorliegenden Arbeit einnimmt, wird auf diese Methode im nächsten Kapitel (1.3) ausführlich eingegangen.

### 1.3 *Yeast surface display*

Das *yeast surface display* wurde im Jahre 1997 von Boder und Wittrup entwickelt<sup>98</sup> und ist ein wirksames Verfahren zur Isolierung von neuartigen Proteinen mit verbesserter Affinität, Spezifität sowie Stabilität<sup>112</sup>. Beispielsweise gelang die Isolierung von T-Zellrezeptor- oder *carcinoembryonic antigen*-bindenden scFv-Mutanten<sup>113, 114</sup>. Desweiteren konnten affin-bindende Antikörper gegen ausgewählte Zielproteine wie Huntington<sup>115</sup> sowie Botulinum Neurotoxin<sup>116</sup> oder den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein<sup>117</sup> isoliert werden. Am häufigsten kommt das Aga1p/Aga2p-System mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zum Einsatz<sup>112</sup>. Dabei wird der Agglutininrezeptor als Anker für die Oberflächenpräsentation von Proteinen verwendet<sup>98</sup>. Dieser besteht aus zwei Proteinen Aga1p und Aga2p, welche kovalent über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind<sup>118-120</sup>. Das *yeast surface display* System setzt sich zum einen aus einer modifizierten Hefe, welche das *aga1*-Gen unter Kontrolle eines Gal1-Promotors im Genom trägt, und zum anderen aus einem Expressionsvektor, auf dem das *aga2*-Gen kodiert ist, welcher ebenfalls unter Kontrolle eines Gal1-Promotors steht, zusammen. Das Gen des zu präsentierenden Proteins wird zuvor in den Vektor kloniert und anschließend *via* Transformation über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* eingebracht<sup>121</sup>. Durch das von Benatuil und Kollegen optimierte Transformationsprotokoll können pro Tag bis zu  $10^9$  Varianten generiert werden<sup>122</sup>. Außerdem entfällt durch die homologe Rekombination im Gegensatz zur Erstellung von kombinatorischen *E. coli* Bibliotheken der *in vitro* Ligationsschritt<sup>123</sup>. Die Auswahl, ob das zu präsentierende Protein N- oder C-terminalen an das Aga2p fusioniert wird, kann entscheidend sein, weil dadurch die Bindungsaffinität des Proteins beeinflusst werden kann<sup>124</sup>. Bei der Induktion mit Galactose wird das zu präsentierende Protein als Aga2p-Fusion exprimiert und kovalent an Aga1p gebunden. Aga1p ist selbst nochmal über einen Glycophosphatidylinositol(GPI)-Anker mit der Zellwand verankert, so dass die Genotyp-Phänotyp-Kopplung gewährleistet ist. Der Nachweis

der Oberflächenpräsentation der Proteinvarianten ist über eine Antikörpermarkierung des N-terminalen Hämagglutinin(HA)-Epitops oder C-terminalen cMyc-Epitops möglich, was in Abb. 1.4 schematisch dargestellt ist. Typischerweise trägt jede Hefezelle ca.  $10^4$  bis  $10^5$  Kopien der jeweiligen Proteinvariante auf der Oberfläche<sup>112</sup>. Die Durchmusterung solcher Proteinbibliotheken erfolgt via Fluoreszenzmarkierung im Ultra-Hochdurchsatzverfahren mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS)<sup>125</sup>. Auch die Dissoziationskonstanten einzelner Proteinvarianten können auf der Hefeoberfläche via Durchflusszytometrie titriert werden, so dass nicht eine sofortige lösliche Produktion notwendig ist. Die generierten Daten dienen hierbei als erste Abschätzung und decken sich mit den generierten Daten aus anderen Messmethoden<sup>126</sup>.



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des von Boder und Wittrup entwickelten *yeast surface display*<sup>98</sup>. In Orange ist das modifizierte Protein, das sogenannte *scaffold*, dargestellt, was von dem HA-Epitop (blau) und dem cMyc-Epitop (gelb) flankiert wird. Das N-terminale Aga2p sowie das in der Zellwand verankerte Aga1p sind in Dunkelgrau dargestellt. Der Nachweis des Zielproteins (grün) und des *scaffolds* auf der Hefeoberfläche können durch bestimmte Antikörper sowie Fluorophor-konjugierte Proteine, wie z.B. Streptavidin-Phycoerythrin erfolgen.

Ein weiterer Vorteil des *yeast surface display* Verfahrens ist, dass die Hefe *S. cerevisiae* ein eukaryotischer Organismus ist, bei dem die korrekte Faltung sowie Glykosylierung von komplexen Proteinen durch die Anwesenheit von Chaperonen begünstigt wird<sup>127</sup> und fehlgefaltete Varianten durch die *unfolded protein response* degradiert werden<sup>128</sup>. Deshalb wurde dieses Verfahren auch schon genutzt, um komplexe Proteine wie Interleukin-2<sup>129</sup>, den T-Zell Rezeptor<sup>130</sup>, EGFR (*epidermal growth factor receptor*)<sup>131</sup> oder GFP (*green fluorescent*

---

*protein*)<sup>132</sup> auf der Hefeoberfläche zu präsentieren und Mutanten für verschiedenste Anwendungen zu isolieren. Auch Miniproteine wie die Trypsin-Inhibitoren EETI-II<sup>133</sup> und MCoTI-II<sup>134</sup> sowie eine verkürzte Version von AgRP (*agouti related protein*)<sup>135</sup> konnten erfolgreich in funktioneller Form auf der Hefeoberfläche präsentiert werden. Hierbei konnten affine Matriptase-1- und Integrin-bindende Miniproteinvarianten isoliert werden. Da in dieser Arbeit neuartige, auf MCoTI-II basierende Bindemoleküle gegen das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) mittels *yeast surface display* isoliert werden sollen, wird dieses Zielprotein in seinem biologischen Kontext im folgenden Abschnitt (1.4) näher beschrieben.

## **1.4 Die Rolle des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens 4 (CTLA-4) als negatives Regulatormolekül der Immunantwort**

### **1.4.1 Das Immunsystem**

Das Immunsystem schützt gegen eindringende oder infektiöse Pathogene, überwacht die Gewebekomöostase und beseitigt geschädigte Zellen<sup>136</sup>. Damit das Immunsystem effizient arbeiten kann, muss es in der Lage sein, zwischen körpereigenen und fremd zu unterscheiden sowie Fremdproteine zu erkennen bzw. sich an sie zu erinnern. Das Immunsystem von höheren Lebewesen besteht aus zwei Komponenten, der natürlichen (angeborenen) und der adaptiven (erworbenen) Immunität<sup>137</sup>. Die natürliche Immunität bildet eine schnelle erste Abwehr, wenn Pathogene die epithelialen Barrieren (Haut oder Schleimhäute) oder die chemische Barriere (antimikrobielle Peptide) überwunden haben. Dabei erkennen beteiligte Immunzellen über Oberflächenrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) pathogen- oder schädigungsassoziierte Antigene, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)<sup>138</sup>. Die durch die PAMP-Erkennung aktivierten Makrophagen beseitigen die Pathogenen über Phagozytose<sup>139</sup>. Falls dieser Mechanismus nicht gelingt und die Pathogenen in die Blutbahn gelangen, werden sie dort über zirkulierende Proteine des Komplementsystems erkannt und ebenfalls *via* Phagozytose beseitigt. Diese erste, unspezifische Immunantwort kann eine Ausbreitung von Infektionen verhindern. Dabei grenzt sie sich von der erworbenen Immunität dadurch ab, dass evolutiv hoch konservierte Strukturen erkannt werden und die Immunantwort ohne eine zuvor ausgelöste Zellproliferation stattfindet<sup>140</sup>. Die erworbene Immunität bildet sich im Laufe der Zeit aus, wenn der Körper Antigenen ausgesetzt und eine spezifische Abwehr gegen diese aufbaut wird<sup>141</sup>. Die Lymphozyten, B-Lymphozyten (B-Zellen), CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Lymphozyten (T-Helfer-

---

Zellen) und CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), sind hierbei die Haupteffektoren und exprimieren eine umfangreiche Bandbreite antigenspezifischer Rezeptoren<sup>136</sup>. Naive B-Zellen sowie T-Zellen entwickeln sich aus Knochenmarkvorläuferzellen und beide repräsentieren die zwei Hauptmechanismen der adaptiven Immunantwort, die humorale und die zellvermittelte Immunantwort. Während T-Zellen die Antigene direkt angreifen, produzieren B-Zellen antigenspezifische Antikörper, sogenannte Immunglobuline<sup>141</sup>. Die Antigenerkennung von B-Zellen über den B-Zell-Rezeptor führt zur Proliferation sowie zur Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. Das Antigen wird durch die Bindung des Antikörpers markiert und anschließend zerstört. Für die vollständige T-Zell-Aktivierung ist eine Kostimulation zweier aufeinanderfolgender Signale notwendig. Das erste Signal ist die Bindung des T-Zell-Rezeptors an das Antigen, welches von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit Hilfe von MHC-I oder MHC-II präsentiert wird<sup>142</sup>, wobei Zellen mit dem CD4-T-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche an MHC-II und mit dem CD8-T-Zell-Rezeptor an MHC-I binden. Das zweite Signal ist die Bindung des APC-Liganden B7.1/B7.2 (CD80/CD86) an den T-Zell-Rezeptor CD28<sup>143</sup>. Diese Kostimulation führt zur Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) und anderen Zytokinen, welche die Zellproliferation sowie die Differenzierung zu aktiven T-Zellen induzieren<sup>142</sup>. Die generierten CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen rekrutieren entweder über die Ausschüttung von IL-2 sowie Interferon Gamma (INF-γ) Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen, welche die Pathogenen beseitigen (T<sub>H</sub>1-Weg), oder interagieren über Interleukin-4 (IL-4) sowie Interleukin-5 (IL-5) mit B-Zellen, welche Antikörper ausschütten (T<sub>H</sub>2-Weg)<sup>144</sup>. Regulatorische T-Zellen, auch Treg-Zellen genannt, sind eine weitere Untergruppe von CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen und nehmen einen Anteil von 5 bis 10 % einer CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation ein<sup>145</sup>. Treg-Zellen inhibieren das Immunsystem, was im gesunden Organismus die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindert. Die Regulation der Immunantwort ist ein aktuelles Forschungsgebiet. Dabei spielen die Inhibition gleichermaßen wie die Aktivierung des Immunsystems eine wichtige Rolle, da sie Grundlagen für therapeutische Ansätze in der Onkologie und bei Autoimmunerkrankungen bieten. Eine zentrale Rolle bei der negativen Regulation der Immunantwort wird dem zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) zugeschrieben, auf welches genauer im nächsten Abschnitt (1.4.2) eingegangen wird.

#### **1.4.2 Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4)**

Das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA-4), auch CD152 genannt, ist eines der am besten untersuchten immunregulatorischen Moleküle, da es

---

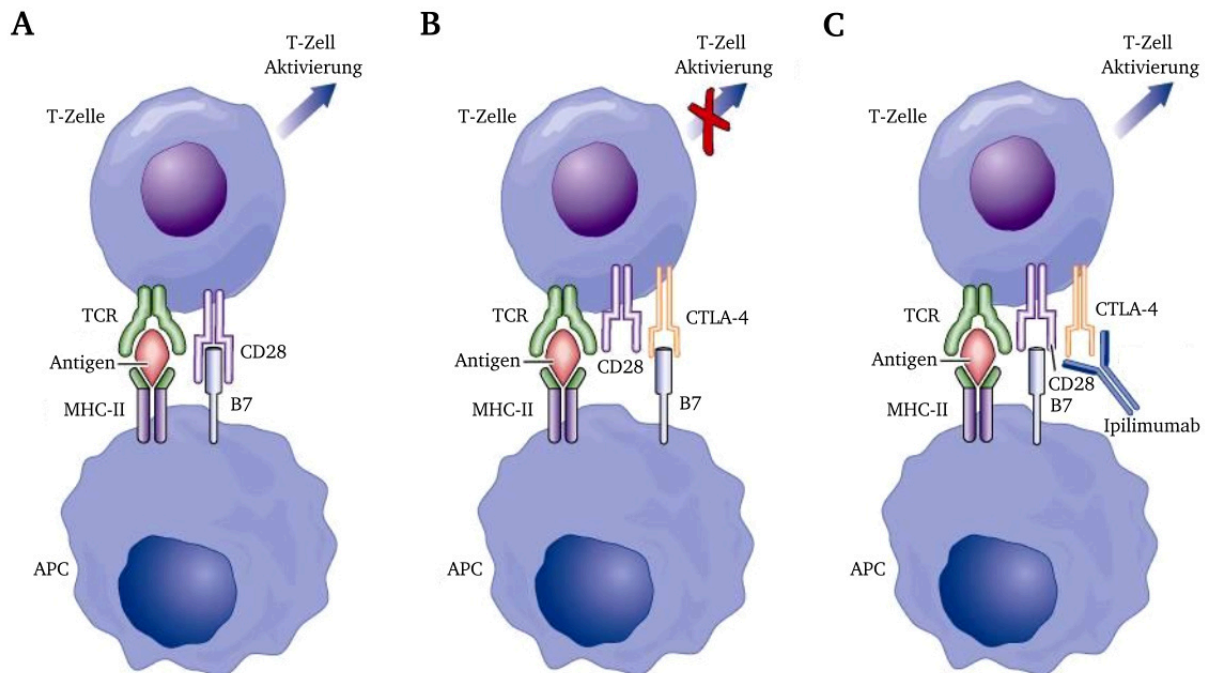
maßgeblich an der Kontrolle der Immunaktivierung beteiligt ist. CTLA-4 gehört zur Familie der Immunglobuline<sup>146</sup> und wird auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert, wobei es eine notwendige Sicherung gegen unerwünschte Autoimmunität darstellt. So wurden beim Menschen CTLA-4-Polymorphismen identifiziert<sup>147</sup>, welche mit Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis<sup>148</sup>, Typ-1-Diabetes<sup>149</sup>, Endokrinopathien<sup>148, 150, 151</sup> und Morbus Addison<sup>150, 152</sup> assoziiert sind. Bei diesen Autoimmunerkrankungen kann eine Inhibition der Immunantwort als Therapie entscheidend sein, was am Beispiel der rheumatoiden Arthritis zum Erfolg führte. Abatacept (Orencia®), ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des humanen CTLA-4 und dem Fc-Teil eines humanen IgG1, wird bereits in der Therapie eingesetzt und seine Wirkung als Immunsuppressivum konnte erfolgreich gezeigt werden<sup>153, 154</sup>.

Wie das positive Regulatorprotein CD28 (1.4.1) ist CTLA-4 ein Homodimer aus zwei glykosylierten Peptidketten (jeweils etwa 35 kDa), die über Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind<sup>155</sup>. Sequenzvergleiche zwischen CD28 und CTLA-4 ergaben, vor allem in der extrazellulären Domäne, eine signifikante Homologie<sup>156</sup> und beide enthalten eine konservierte Sequenzmotiv "MYPPY", wodurch beide an die APC-Oberflächenproteine B7.1 (CD80) bzw. B7.2 (CD86) binden können<sup>157</sup>. CTLA-4 bindet dabei an beide Liganden mit einer signifikant höheren Affinität als CD28<sup>158</sup>. CTLA-4 wird normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen auf der T-Zelloberfläche exprimiert. Bei der T-Zellaktivierung wird CTLA-4 hochreguliert<sup>159</sup> und konkurriert mit CD28 um die Liganden, wobei die Bindung von CTLA-4 an B7.1 bzw. B7.2 zur Inhibition der T-Zellrezeptor-Signaltransduktion<sup>160</sup> und zur Expression des Zytokins *transforming growth factor-β* (TGF-β) führt, welches die Immunreaktion unterdrückt<sup>161</sup>.

Jedoch ist CTLA-4 nicht nur ein interessantes Molekül zur Inhibition des Immunsystems bei Autoimmunerkrankungen, sondern auch die Blockade des CTLA-4 Signalwegs und somit die anhaltende Aktivierung der Immunantwort stellt ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Onkologie dar. Zwei humanisierte Antikörper, Ipilimumab und Tremelimumab, befinden sich für eine Reihe von Krebsarten in der klinischen Entwicklung<sup>162-164</sup>. Ipilimumab (YERVOY®) wurde von der EMA für die Behandlung von fortgeschrittenen Melanomen bei Erwachsenen, die bereits zuvor eine Therapie erhalten haben, zugelassen<sup>165</sup>. Die monoklonalen anti-CTLA-4-Antikörper konkurrieren mit den APC-Liganden B7.1 bzw. B7.2 um die Bindung an CTLA-4 auf den aktivierten T-Zellen. Wenn die Antikörper an CTLA-4 binden, so blockieren sie den negativen Signalweg und verlängern die T-Zell-Aktivierung, so dass die T-Zell-Proliferation wiederhergestellt und die T-Zell-vermittelte Immunität potenziert



wird<sup>166, 167</sup>. Es wird vermutet, dass diese Effekte die Fähigkeit von Patienten stärken, eine Antitumor-Immunantwort aufzubauen<sup>166, 168</sup>. Durch die Behandlung mit Ipilimumab konnte in einer Phase-III-Studie eine erhöhte Überlebensrate der Patienten festgestellt werden<sup>163</sup>. Der Wirkmechanismus von Ipilimumab ist in Abb. 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung des Wirkmechanismus eines anti-CTLA-4-Antikörpers am Beispiel von Ipilimumab. (A) *antigen-presenting cells* (APC) präsentieren Tumorantigene über den *major histocompatibility complex* (MHC) und interagieren darüber mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR). Für eine vollständige T-Zell-Aktivierung ist das kostimulatorische Signal über die Interaktion von CD28 und B7 notwendig. (B) Es erfolgt eine Hochregulation von CTLA-4 auf der T-Zelloberfläche und CTLA-4 bindet an B7, was eine zu starke T-Zell-vermittelte Immunreaktion bremst. (C) Im Falle des metastasierten Melanoms ist eine verstärkte Immunantwort erwünscht. Der monoklonale anti-CTLA-4-Antikörper Ipilimumab bindet an CTLA-4 und verhindert damit dessen Interaktion mit B7. Damit fällt der inhibierende Einfluss von CTLA-4 auf die T-Zellen weg und die T-Zell-Antwort wird potenziert. Modifiziert nach Bristol-Myers Squibb, 2011<sup>165</sup>.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Krebsimmuntherapie ist, dass sie eine antigenunabhängige Methode darstellt, da keine genauen Kenntnisse über die tumorspezifischen Antigene vorhanden sein müssen. Die Tatsache, dass Tumorgewebe eine geringe Immunogenität aufweist, wurde in zwei Studien am Mausmodell durch eine gleichzeitige Verabreichung von anti-CTLA-4-Antikörper mit einer niedrig dosierten Chemotherapie<sup>169</sup> oder mit *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)<sup>170</sup> angegangen und führte zur erfolgreichen Eliminierung des Tumors.

---

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, basierend auf dem Cystinknoten-Miniprotein MCoTI-II neuartige, selektive sowie affine Bindemoleküle des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens 4 (CTLA-4) zu isolieren, welches aufgrund seines therapeutischen Potenzials als Zielprotein für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde. Zunächst soll dafür eine kombinatorische Miniproteinbibliothek über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* erstellt und anschließend die Funktionalität der auf der Hefeoberfläche präsentierten Variantenbibliothek überprüft werden. Die Selektion auf CTLA-4-Bindemoleküle und die Analyse der identifizierten Varianten soll über das *yeast surface display* Verfahren mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) erfolgen. Die affinsten sowie spezifischsten Miniproteinvarianten sollen chemisch synthetisiert und biochemisch charakterisiert werden. Ein möglicher Aviditätseffekt und somit eine Verbesserung der Bindungsaffinität soll durch die Oligomerisierung von Miniproteinen erreicht werden.



---

## 2 Materialien

---

### 2.1 Bakterien-, Hefestämme und verwendete Zelllinien

#### 2.1.1 Bakterienstämme - *Escherichia coli*

**BL21(DE3)** (Studier & Moffatt, 1986)<sup>171</sup>

[F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])]*

**DH5α** (Fa. Invitrogen)

[F<sup>-</sup> φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) *phoA*supE44 *thi-1 gyrA96 relA1 λ*-]

**ER2738** (New England Biolabs)

[F<sup>+</sup> *proA*<sup>+</sup>B<sup>+</sup> *lacI*q Δ(*lacZ*)M15 *zzf::Tn10*(TetR)/ *fhuA2 glnV* Δ(*lac-proAB*) *thi-1* Δ(*hsdS-mcrB*)5]

**SHuffle™ T7** (New England Biolabs)

[*fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (SpecR)Δ*trx*B *sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10]*

**TOP10** (Fa. Invitrogen)

[F<sup>-</sup> [*lacI*<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)] *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)* φ80 *lacZ* M15 *lacX74 recA1 deoR araD139 (ara<sup>+</sup>leu)7697 galU galK rpsL (str<sup>R</sup>) endA1 nupG]*

#### 2.1.2 Hefestämme - *Saccharomyces cerevisiae*

**EBY100** (Boder, 1997)<sup>98</sup>

[a *GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS2 prb1Δ1.6R can1 GAL*), Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>]

---

### 2.1.3 Phagen

M13-vcs-Helferphage (Stratagene)

### 2.1.4 Zelllinien

CHO-K1 (BioNTech AG)

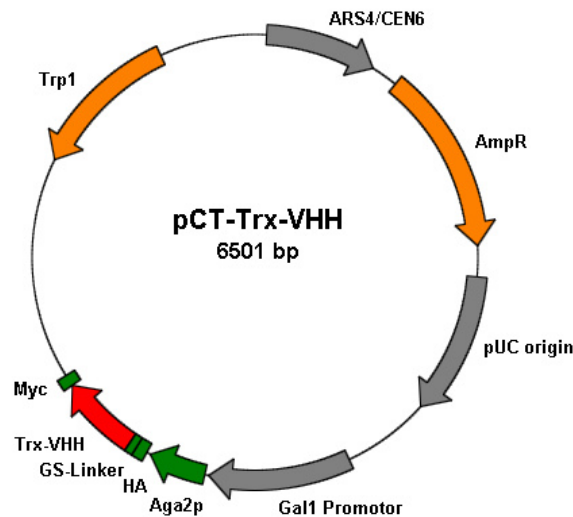
CHO-K1-MOCK (BioNTech AG)

CHO-K1-CTLA-4 (BioNTech AG)

## 2.2 Plasmide

### 2.2.1 pCT-Trx-VHH/pCT-SnoaL

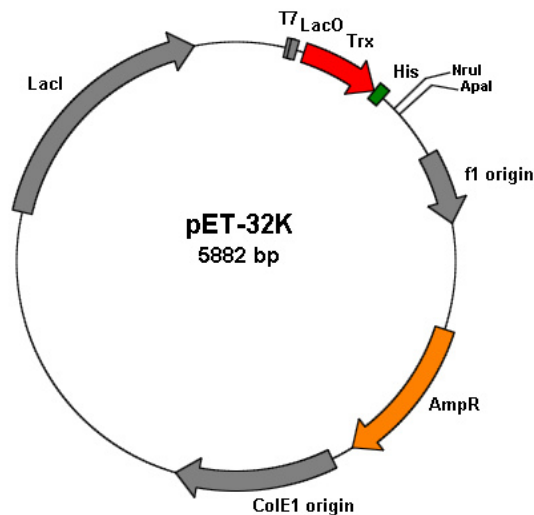
Die Plasmide pCT-Trx-VHH sowie pCT-SnoaL, die für das Aga1p/Aga2p System genutzt werden, wurde vom Arbeitskreis zur Verfügung gestellt. Der pCT-Vektor weist einen Replikationsursprung für Hefen (ARS4/CEN6) und Bakterien auf (pUC *origin*) und liegt in Hefen als *single copy* Plasmid vor, so dass eine Amplifikation durch Retransformation in *E. coli* notwendig ist, wofür das pUC *origin* benötigt wird. Für die Selektion des Vektors in Bakterien wird das codierte  $\beta$ -Lactamase Gen (AmpR) genutzt, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt. Hefen, die den pCT-Vektor tragen, können durch den auxotrophen Marker Trp1 Tryptophan synthetisieren und somit selektiert werden. Das auf der Hefeoberfläche zu präsentierende Fusionsprotein, welches aus der Agglutinin-Untereinheit 2 (Aga2p) und dem Protein der Wahl besteht, welches N-terminal durch das Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) und C-terminal von einem cMyc-Epitop flankiert wird, steht unter der Kontrolle eines Galactose-Promoters (Gal1/10 Promoter). Zwischen Aga2p und dem zu präsentierenden Protein (Trx-VHH oder SnoaL) liegt ein Glycin-Serin-Linker (GS-Linker), durch welchen sterische Bindungsprobleme vermieden werden. Durch den Nachweis des N- oder C-terminalen Epitops mittels Antikörpermarkierung kann die Oberflächenpräsentation detektiert und quantifiziert werden.



**Abb. 2.1:** Genetische Karte des Plasmides pCT-Trx-VHH. Die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente sind durch Pfeile dargestellt. **ARS4-CEN6:** *S. cerevisiae* Replikationsursprung, **AmpR:** Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikaresistenz), **pUC origin:** *E. coli* Replikationsursprung, **Gal1 Promotor:** Region des Galactose-Promotors, **Aga2p:** Kodierende Sequenz der zweiten  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheit, **HA:** kodierende Sequenz des Hämagglutinin-Epitops, **GS-Linker:** Abstandhalter bestehend aus der Wiederholung von vier Glycinen und einem Serin, **Trx-VHH:** kodierende Sequenz eines Thioredoxin bindenden VHH-Antikörpers, **Myc:** kodierende Sequenz des cMyc-Epitops, **Trp1:** kodierendes Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker).

### 2.2.2 pET-32K

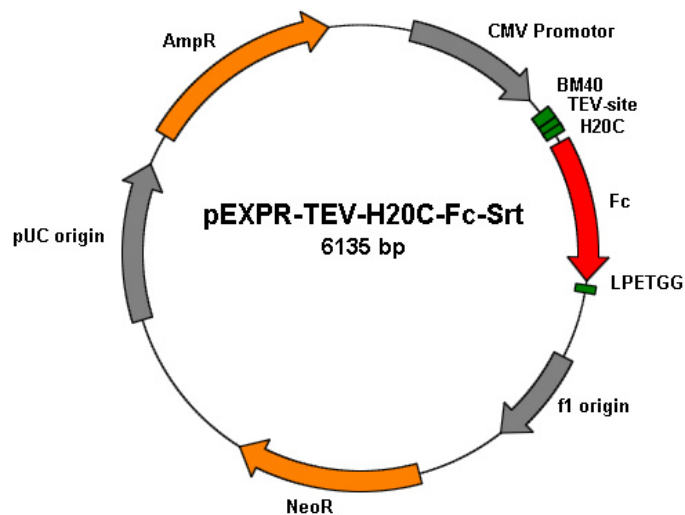
Das Plasmid pET-32K wurde von der BioNTech AG zur Verfügung gestellt und dient zur Expression des Zielproteins mit *N*-terminal fusioniertem Thioredoxin. Die Reinigung des produzierten Fusionsproteins kann mittels IMAC (3.4.9.1) erfolgen, da zusätzlich ein Hexa Histidin Tag (His-Tag) zwischen Thioredoxin und Zielprotein angefügt wurde. Der Vektor besitzt zusätzlich eine Thrombin-Spaltstelle, welche für die Erkennungssequenz von Thrombin kodiert. Thrombin spaltet innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz (LVPR-GS)<sup>172</sup> und kann somit Zielprotein von Thioredoxin sowie His-Tag trennen. Das Zielprotein steht unter der Kontrolle eines Lac-Promotors und wird somit mit IPTG induziert. Die genetische Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin (AmpR).



**Abb. 2.2:** Genetische Karte des Plasmides pET-32K. Die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente sind durch Pfeile dargestellt. **T7:** genetische Information des Bakteriophagen T7 Promotors, **LacO:** Promotor/Operator-Region des Lactose-Operons, **Trx:** kodierende Sequenz des Thioredoxins, **His:** kodierende Sequenz für Hexahistidin Polypeptid, **NruI:** Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *NruI*, **ApaI:** Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *ApaI*, **f1 origin:** Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1, **AmpR:** kodierende Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase, **ColE1 origin:** Replikationsursprung des Plasmids colE1, **LacI:** Gen des *Escherichia coli* Lac-Repressors für das LacI-Protein.

### 2.2.3 pEXPR-TEV-H20C-Fc-Srt

Das Plasmid pEXPR-TEV-H20C-Fc-Srt wurde vom Arbeitskreis von M. Sc. Stephan Dickgießer zur Verfügung gestellt und basiert auf dem Mammalia-Expressionsvektor pEXPR-IBA42 (IBA Biotechnology, Göttingen). Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von Fusionsproteinen in Mammalia-Zellen und trägt einen humanen Zytomegalievirus (CMV) Promotor. Zur Selektion enthält der Vektor eine Ampicillin(AmpR)- sowie Neomycin(NeoR)-Resistenzkassette. Die rekombinanten Fusionsproteine werden durch die BM40-Signalsequenz ins Medium sekretiert. Das Plasmid pEXPR-TEV-H20C-Fc-Srt besitzt zusätzlich eine TEV-Spaltstelle (ENLYFQ-S), welche von der TEV-Protease aus dem Tabakmosaikvirus selektiv gespalten wird<sup>173</sup>. Außerdem enthält es einen H20C-Linker, eine Hinge-Region aus 20 Aminosäuren mit den natürlichen Cysteinen, sowie einen humanen Fc-Teil und einer Sortase A-Erkennungssequenz (LPETGG)<sup>174</sup>.



**Abb. 2.3:** Genetische Karte des Plasmides pEXPR-TEV-H20C-Fc-Srt. Die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente sind durch Pfeile dargestellt. **CMV Promotor:** Region des humanen Zytomegalievirus Promotors, **BM40:** Region der BM40-Signalsequenz, **TEV-site:** kodierend für die Erkennungssequenz der TEV-Protease, **H20C:** Region des H20C-Linkers, **Fc:** kodierende Sequenz eines humanen Fc-Teils, **LPETGG:** kodiert die Sortase-Erkennungssequenz, **f1 origin:** Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1, **NeoR:** Neomycin Resistenzgen, **pUC origin:** *E. coli* Replikationsursprung, **AmpR:** kodierende Sequenz für die  $\beta$ -Lactamase.

## 2.3 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

### 2.3.1 DNA-Längenstandards

Die DNA-Längenstandards wurden mit *Aqua* bidest und Auftragspuffer auf eine DNA-Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt und dann bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **Lambda DNA/*Eco47I*(*AvaII*) Marker, 13** (Fermentas)

Der Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13 enthält 36 definierte Fragmente, wofür Lambda-DNA vollständig mit *Eco47I* gespalten und gereinigt wurde. Die Fragmente haben folgende Basenpaarlängen: 8126, 6555, 6442, 3676, 2605, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 72, 67, 45, 42, 32, 28, 23.

#### ***O'GeneRuler™ Ultra low Range DNA Ladder*** (Fermentas)

Der *O'GeneRuler™ DNA Ladder* enthält ein Gemisch aus 11 individuellen DNA-Fragmenten, die über Chromatographie gereinigt wurden. Die Fragmente haben folgende Basenpaarlängen: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10.

---

## **2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) (New England Biolabs)**

Der 2-Log DNA Ladder enthält 19 definierte Fragmente, wofür eine Reihe von Plasmiden mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten wurden. Die Fragmente haben folgende Basenpaarlängen: 10002, 8001, 6001, 5001, 4001, 3001, 2017, 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100.

### **2.3.2 Molekulargewichtsmarker für Proteingelelektrophorese**

#### ***Unstained Protein Molecular Weight Marker, #SM0431* (Fermentas)**

Der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* ist ein Gemisch aus sieben verschiedenen, gereinigten Proteinen. Er dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Banden des Markers können im Anschluss an die Proteinelektrophorese mit Coomassie-Brillant-Blau-R-250 gefärbt werden. Die einzelnen Proteine haben folgendes Molekulargewicht in kDa: 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14.

#### ***PageRuler™ Prestained Protein Ladder, #SM0671* (Fermentas)**

Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* ist aus zehn rekombinanten, gereinigten und gefärbten Proteinen zusammengesetzt. Dieser Marker dient der Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels *Western Blot* analysiert werden. Die einzelnen Proteine haben folgendes Molekulargewicht in kDa: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10.

#### ***Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)* (New England Biolabs)**

Der *Prestained Protein Marker, Broad Range* ist ein Mix aus acht gereinigten Proteinen, die kovalent an einen blauen Farbstoff gekoppelt sind. Dieser Marker dient der Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels *Western Blot* analysiert werden. Die einzelnen Proteine haben folgendes Molekulargewicht in kDa: 175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7.

---

## 2.4 Oligodesoxyribonukleotide

### Dimeric-CTLA-4-GS-up-außen

5`-d(CCCTGGAAAGTGTATCTGCCGTGGTAACGGTTACTGCGGTGGCGGCGGCGGCTCCGGCG  
GCGGCGGCTCC)-3`

### Dimeric-GS-MCopt-up-innen

5`-d(GGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGATCCGGTTCGGCCGGTGGCGCC)-3`

### Dimeric-MCopt-Myc-lo-innen

5`-d(CTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGAGGCACCGCAGTAACCGTTAC  
C)-3`

### Dimeric-Myc-XhoI-lo-außen

5`-d(CAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTTATCAGATCTCGAGCTATTACAAGTCCTC  
TTC)-3`

### F1-up

5`-d(ACCCTGCAGGCGGAAACCGA)-3`

### H20-Cys-rev

5`-d(GCGCGCGGGCCCGCCCAGCAGTTCAGGGGCAGGGCAGGAGGACAGGTGTGGGTCTTGT  
CGCAGCTCTTGGGCTCGCTTCC)-3`

### MCopt-for

5`-d(GCGCGCGCTAGCCGCTCCCAGATGCAAGTACAGCCACGTGCCCTGCAGACGGGACAGCG  
ATTGCCCTGGCAAG)-3`

### MCopt-H20-intern

5`-d(CAGCGATTGCCCTGGCAAGTGCATCTGCCGGGGCAATGGCTACTGTGGCGGAAGCGAGC  
CCAAGAGC)-3`

### pCT-MCopt-lo

5`-d(ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCACCGCAGTA  
ACCGTTACCACG)-3`

---

#### pCT-MCopt-up

5`-d(GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGGGGGT  
GGTTCGGCCGGTGGCGCC)-3`

#### pCT-lib-fwd

5`-d(GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC)-3`

#### pCT-lib-rev

5`-d(ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCC)-3`

#### pCT-Seq-lo

5`-d(GCGCGCTAACGGAACGAAAAATAGAAA)-3`

#### pCT-Seq-neu-up

5`-d(AGGACAATAGCTCGACGATTG)-3`

#### pEXPR-for

5`-d(GAGAACCCACTGCTTACTGGC)-3`

#### pEXPR-rev

5`-d(TAGAAGGCACAGTCGAGG)-3`

## 2.5 Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren

**Tabelle 2.1:** Auflistung der verwendeten Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren.

Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren	Hersteller
Abatacept (Orencia <sup>®</sup> , CTLA-4-Ig)	Bristol Myers Squibb
Accutase	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Bovine Serum Albumin (BSA)	GERBU Biotechnik GmbH
Cetuximab	Merck KGaA Darmstadt
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co KG
ExtrAvidin-HRP	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glucose-Oxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH



Lambda DNA/ <i>Eco</i> 47I ( <i>Ava</i> II) <i>Marker</i> , 13	MBI Fermentas
2-Log DNA <i>Ladder</i> (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs
Meerrettich-Peroxidase (HRP) Typ VI-A	Sigma Aldrich Chemie GmbH
NeutrAvidin	Pierce
<i>O'GeneRuler™ Ultra low Range DNA Ladder</i>	MBI Fermentas
Oligodesoxyribonukleotide	Sigma Aldrich Chemie GmbH
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	MBI Fermentas
Phusion® <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase	New England Biolabs
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i> (7-175 kDa)	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
Streptavidin-Allophycocyanin	eBioscience
Streptavidin-Cy3	Rockland Immunochemicals
Streptavidin-R-Phycocyanin	Invitrogen GmbH
Streptavidin-Phycocyanin	eBioscience
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	AK Kolmar (TU Darmstadt)
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	MBI Fermentas
<i>Yeast lytic enzyme</i>	MP Biomedicals

## 2.6 Antikörper

**Tabelle 2.2:** Auflistung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Anti-CTLA-4 (monoklonal, Maus)	BD Pharmingen™
Anti-HA-Epitop IgG (monoklonal, Maus)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti-Maus IgG Biotin (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH

---

Anti-Maus IgG FITC (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti-Kaninchen IgG Biotin (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti-cMyc-Epitop IgG (monoklonal, Maus)	AK Friedl (TU Darmstadt)
Anti-V5 Tag IgG (monoklonal, Maus)	eBioscience
Anti-Human IgG Phycoerythrin (Fc-gamma spezifisch, polyklonal, Ziege)	eBioscience
Anti-Human IgG HRP (Fc-spezifisch, polyklonal, Ziege)	Antikörper-Online
Anti-M13-pVIII-HRP (monoklonal, Maus)	New England Biolabs
Anti-Ziege IgG Biotin (polyklonal, Kaninchen)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Penta His Alexa Fluor 488 (monoklonal, Maus)	Qiagen GmbH

## 2.7 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden standardmäßig von den folgenden Herstellern erworben und unverändert eingesetzt:

Becton Dickinson

Fluka

Invitrogen

Life Technologies

Merck Chemicals

Roth

Sigma Aldrich

Stratagene

---

## 2.8 Sonstige Materialien und Geräte

**Agilent Technologies, Santa Clara, USA**

Varian 920/940-LC System mit Phenomenex Hypersil 5u BDS C18 LC *Column*

**Becton Dickinson, New Jersey, USA**

BD Influx™ *cell sorter*

**BioRad, München, D**

*Gene Pulser*® und *Pulse Controller*

**Carl Zeiss, Oberkochen, D**

Fluoreszenzmikroskop AX 10

**CEM GmbH, Kamp-Lintfort, D**

CEM Liberty Peptidsynthesizer

**Dako Cytomation, Fort Collins, USA**

*Fluorescence activated cell sorter* (FACS), MoFlo® Cytometer mit Cyclone Sortiereinheit, Summit® v4.3 Software-Paket

**FortéBio, Menlo Park, USA**

Octet RED® mit Analyse Software

**GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA**

Äkta Basic UV900 P900 Frac 900, Unicorn 3.1 Software

**Heraeus Holding GmbH, Hanau, D**

Biologische Sicherheitswerkbank LaminAir HLB 2460 BS, Klasse II

---

Shimadzu, Columbia, USA

LCMS 2020 Massenspektrometer mit Phenomenex Jupiter 5u C4 LC Column

SLM Instruments, Inc, Urbana, USA

*French Pressure Cell Press*

Tecan Group Ltd., Mannedorf, CH

ELISA-Reader, GENios™

Alle nicht explizit aufgeführten Geräte bzw. Chemikalien, gehören zur Grundausstattung eines biochemischen Laboratoriums.

## 2.9 Nährmedien

### 2.9.1 *Escherichia coli*

#### dYT-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

Zur Sterilisation wurden die Nährmedien 20 min bei 120 °C autoklaviert. Um Agar-Platten herzustellen, wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zum Medium hinzugegeben. Die Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/L Chloramphenicol bzw. 100 mg/L Ampicillin hinzugegeben.

### 2.9.2 *Saccharomyces cerevisiae*

#### YPD-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2 % (w/v) Glucose

#### YPG-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2 % (w/v) Galactose

---

### **SDCAA-Medium**

2 % (w/v) Glucose, 0,67 % (w/v) *yeast nitrogen base*, 0,5 % (w/v) *casamino Acids*, 38 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4]

### **SGCAA-PEG-Medium**

2 % (w/v) Galactose, 0,67 % (w/v) *yeast nitrogen base*, 0,5 % (w/v) *casamino acids*, 38 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [pH 7,4], 10 % (w/v) Polyethylenglycol 8000

Zur Sterilisation wurden die Nährmedien 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hierbei wurden Glucose, Galactose, *yeast nitrogen base*, *casamino acids* und Antibiotika separat sterilfiltriert und zugesetzt. Um Agar-Platten herzustellen, wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zum Medium hinzugegeben. Von den erstellten 100-fach konzentrierten Stammlösungen der Antibiotika wurde den Nährmedien 60 mg/L Ampicillin und 100 mg/L Streptomycin zugesetzt. Ketoconazol wurde aus der entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 0,25 mg/L hinzugegeben.

## **2.9.3 Zelllinien**

### **DMEM/-F12+ Glutamax-Medium**

DMEM/-F12+Glutamax-Medium, 10 % (v/v) Fetales Kälberserum, 1 % (v/v) Pen-Strep

Alle Medienbestandteile wurden bei den aufgeführten Herstellern erworben und in der biologischen Sicherheitswerkbank supplementiert. Zur Selektion wurde Hygromycin (200 mg/L) zum Nährmedium zugesetzt.

## 2.10 Lösungen und Puffer

Tabelle 3.5.: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Lösungen und Puffer	Menge
<b>Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer</b>	
Tris-HCl (pH 9,0)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
<b>Ammoniumacetat-Stammlösung</b>	
NH <sub>4</sub> Ac	7 M
<b>Ampicillin-Stammlösung</b>	
Ampicillin (Na-Salz), sterilfiltriert	100 mg/mL
<b>Amp-Strep-Stammlösung</b>	
Ampicillin	6 mg/mL
Streptomycin	10 mg/mL
<b>APS-Stammlösung</b>	
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v)
<b>Chloramphenicol-Stammlösung</b>	
Chloramphenicol	25 mg/mL in 96 % (v/v) Ethanol

---

### **Citratpuffer, pH 3**

tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1,3 g
----------------------------	-------

Zitronensäure-Monohydrat	4,3 g
--------------------------	-------

ad 250 mL Wasser, sterilfiltrieren und autoklavieren.

### **Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE**

Coomassie R-250	0,2 % (w/v) in Methanol
-----------------	-------------------------

Essigsäure	20 % (w/v)
------------	------------

Beide Lösungen vor Gebrauch 1:1 mischen.

### **dNTP-Lösung für PCR**

dATP	12,5 mM
------	---------

dCTP	12,5 mM
------	---------

dGTP	12,5 mM
------	---------

dTTP	12,5 mM
------	---------

### **DNA *Loading Dye* (6x)**

Tris-HCl, (pH 7,6)	10 mM
--------------------	-------

Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
----------------	--------------

Xylencyanol	0,03 % (w/v)
-------------	--------------

Glycerin	60 % (v/v)
----------	------------

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	60 mM
---------------------------------	-------

### **E-Puffer nach Benatuil**

Sorbitol	1 M
----------	-----

CaCl <sub>2</sub>	1 mM
-------------------	------

<b>Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)</b>	
Ethidiumbromid	10 mg/mL
<b>Faltungspuffer</b>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 % (v/v)
Trifluorethanol (TFE)	10 % (v/v)
Guanidinhydrochlorid (Gu-HCl)	1 M
Natriumphosphat-Puffer (pH 7)	50 mM
<b><i>Freezing solution</i></b>	
Glycerin	2 % (v/v)
Yeast Nitrogen Base	0,67 % (w/v)
<b>Hefelysis-Puffer</b>	
Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
NaCl	100 mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	1 mM
Triton X-100	2 % (v/v)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	1 % (w/v)
<b>Hoechst-Puffer</b>	
Harnstoff	8 M
Tris-Base	200 mM
1,4-Dithiothreitol (DTT)	200 mM
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,15 mM



<b>Kanamycin-Stammlösung</b>		
Kanamycin, sterilfiltriert		75 mg/mL
<b>Ketoconazol-Stammlösung</b>		
Ketoconazol		25 mg/mL in 96 % (v/v) Ethanol
<b>Imidazol-Puffer</b>		
Imidazol-HCl (pH 7,8)		1 M
<b>IPTG-Stammlösung</b>		
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)		1 M
<b>Laemmli Lauf-Puffer für die SDS-PAGE</b>		
Tris-HCl		25 mM
Glycin		200 mM
Sodiumdodecylsulfat (SDS)		0,1 % (w/v)
<b>Laemmli Sammelgel-Puffer</b>		
Tris-HCl (pH 6,8)		1,25 M
<b>Laemmli Trenngel-Puffer</b>		
Tris-HCl (pH 8,0)		1,875 M
<b>LiAc/DTT Puffer</b>		
Lithiumacetat		100 mM
1,4-Dithiothreitol (DTT)		10 mM

---

### Meerrettichperoxidase(HRP)-Stammlösung

Peroxidase

0,375 U/mL in 1x PBS

### MPBS

Milchpulver

1 % (w/v) in 1x PBS

### Natriumcarbonat-Puffer, pH 9,5

$\text{Na}_2\text{CO}_3$

0,1 M

$\text{NaHCO}_3$

0,1 M

$\text{NaCl}$

0,1 M

### Natriumphosphat-Puffer, pH 7

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1,08 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1,72 g

ad 1 L Wasser, sterilfiltrieren und autoklavieren.

### PBS (*phosphat buffered saline*), (1x)

$\text{NaCl}$

140 mM

$\text{KCl}$

10 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$

6,4 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

2 mM

### Phagen-Fällungspuffer

PEG 8000

20 % (w/v)

$\text{NaCl}$

2,5 M

Zur längeren Haltbarkeit autoklavieren.

<b>S-Puffer</b>	
Sorbitol	1 M
PIPES (pH 6,5)	10 mM
<b>Sucrosefarbmarker (für DNA-Gelelektrophorese)</b>	
D-Saccharose	60 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,1 % (w/v) in TAE-Puffer
<b>T4-DNA-Ligase-Puffer</b>	
Adenosintriphosphat (ATP)	5 mM
1,4-Dithiothreitol (DTT)	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
Tris-HCl (pH 7,8)	400 mM
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	
Tris-Acetat	2 M
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	50 mM
<b>Taq-Puffer (10x)</b>	
Tris-HCl (pH 8,8)	750 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

<b>TE-Puffer</b>	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,5 mM
Tris-HCl	10 mM
<b>TPBS-Puffer</b>	
Tween 20	0,05 % (v/v) in 1x PBS
<b>Tris-DTT Puffer</b>	
Tris-HCl (pH 8.0)	1 M
1,4-Dithiothreitol (DTT)	2,5 M
<b>Trypanblaulösung</b>	
Trypanblau	4 % (w/v)
<b><i>Yeast lytic enzyme</i> Stammlösung (200 U/mL)</b>	
<i>Yeast lytic enzyme</i>	2 mg/mL in S-Puffer

Soweit nicht explizit aufgeführt, wurden alle Puffer und Lösungen mit demineralisiertem Wasser angesetzt.

## 2.11 Kits

***Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*** (Promega)

***Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*** (Promega)

***Pure Yield™ Plasmid Midiprep System*** (Promega)

---

## 3 Methoden

---

### 3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1.1 Arbeiten mit Bakterien

Die Kultivierung und Vermehrung der verwendeten *Escherichia coli* Stämme erfolgte aerob bei 37 °C in dYT-Medium (2.9.1). Sofern die Bakterien eine Plasmid-vermittelte Antibiotika-Resistenz aufwiesen, wurde das entsprechende Antibiotikum dem Medium zur Selektion zugesetzt. Die Kultivierung der Flüssigkulturen geschah im Inkubationsschüttler (Satorius, Centromat BS-1) bei 180 U/min, die Kultivierung von Kolonien bei 37 °C auf festem dYT-Medium mit 1,5 % Agar. Ausgewählte Einzelklone von dYT-Agar-Platten wurden in einem Volumen von 5 mL dYT-Medium in sterilen Reagenzröhrchen kultiviert. Die langfristige Lagerung der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte bei -80 °C nach Zugabe von 10 % (v/v) DMSO. Ausgewählte Einzelklone wurden auf dYT-Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

#### 3.1.2 Arbeiten mit Phagen

Der *E. coli* Stamm ER2738 mit dem verwendeten Phagemid-Vektor wurde in 5 mL tetracyclin- und chloramphenicolhaltigem dYT-Medium in Röhrchen bei 37 °C unter Schütteln, bis zu einer leichten Trübung des Mediums angezogen. Es wurden 10 µL Helferphagen M13VCS hinzugegeben und jeweils 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln und anschließend stehend inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 mL dYT-Medium, komplettiert mit Kanamycin/Tetracyclin/Chloramphenicol, transferiert und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Abschließend wurde mittels Zugabe von 50 µL IPTG (1 M) die Fusionsproteinproduktion gestartet und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Zur Phagenfällung wurde die Bakterienkultur am nächsten Tag in ein 50 mL Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 4000 U/min). 35 mL des Überstands wurden in ein neues 50 mL Röhrchen transferiert, mit 10 mL Phagenfällungspuffer versetzt, kräftig gemischt und für 4 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Phagen für 12 min bei 12000 U/min zentrifugiert (Kühlzentrifuge 3K30, Sigma) und der Überstand verworfen. Das Phagenpellet wurde getrocknet, in 1 mL PBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nach der darauf folgenden Zentrifugation (1 min, 13200 U/min) wurde der Überstand, der nun die Phagen enthielt, erneut in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß transferiert. Die produzierten Phagen wurden dann bei 4 °C im Kühlschrank eingelagert.

---

### 3.1.3 Phagenproduktion in *deepwell*-Platten

Zur Isolierung von Zielprotein-bindenden Phagen wurde die Phagenproduktion in *deepwell*-Platten durchgeführt. Dafür wurden die Einzelklone in den Kavitäten, welche je 400  $\mu\text{L}$  dYT-Medium versetzt mit Tetracyclin (Tet) und Ampicillin (Amp) enthielten, inokuliert und über Nacht bei 30 °C sowie 800 U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine neue *deepwell*-Platte, welche je 600  $\mu\text{L}$  dYT-Amp/Tet-Medium in den Kavitäten enthielt, mit je 30  $\mu\text{L}$  Einzelklon-Übernachtskultur und 0,5  $\mu\text{L}$  M13VCS Helferphage (ca.  $5 \cdot 10^{11}$  Phagen/mL) pro Kavität inokuliert. Die Platte wurde für 1 h schüttelnd (800 U/min) bei 37 °C sowie 1 h stehend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Kavität 400  $\mu\text{L}$  dYT-Amp/Tet/Kan-Medium hinzugegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C sowie 800 U/min wurden pro Kavität 800  $\mu\text{L}$  dYT-Amp/Tet/Kan-Medium mit IPTG (1 mM Endkonzentration) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 30 °C sowie 800 U/min. Für den Phagen-ELISA (3.6.2.2) wurde die *deepwell*-Platte bei 4000 U/min für 30 min zentrifugiert und 50  $\mu\text{L}$  des Überstands, in dem sich die produzierten Phagen befanden, verwendet.

### 3.1.4 Bestimmung des Phagentiters

Es wurde mit Hilfe von PBS eine Verdünnungsreihe aus der Phagensuspension erstellt (jeweils 10  $\mu\text{L}$  Phagenlösung und 990  $\mu\text{L}$  PBS). Anschließend wurden je 10  $\mu\text{L}$  aus den Verdünnungslösungen  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-10}$  mit 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* ER2738 Zellen aus einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 für 30 min bei 37 °C stehend inkubiert, so dass eine Endverdünnung von  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-12}$  vorlag. Die kompletten 110  $\mu\text{L}$  *E. coli*-Phagensuspension wurden auf chloramphenicolhaltige Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und auf die Phagenanzahl je Milliliter zurückgerechnet.

### 3.1.5 Arbeiten mit Hefen

Die Kultivierung und Vermehrung der verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme erfolgte in YPD-Medium bei 30 °C und 200 U/min im Inkubationsschüttler. Im Fall eines Plasmid-vermittelten Auxotrophiemarkers wurden die Hefen in SDCAA-Medium (2.9.2) kultiviert. Die Kultivierung von Kolonien geschah bei 30 °C auf festem YPD- oder SDCAA-Medium mit 1,5 % Agar. Ausgewählte Einzelklone wurden in einem Volumen von 2 mL SDCAA-Medium und 7 mL SGCAA-PEG-Medium in sterilen Reagenzröhrchen kultiviert. Die langfristige Lagerung der verwendeten Hefestämme oder Hefebibliotheken erfolgte nach Zugabe von *freezing*

---

*solution* (2.10) bei -80 °C. Ausgewählte Einzelklone wurden auf SDCAA-Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 30 °C kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

### 3.1.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterien- oder Hefezellsuspension erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Photometer (Bio Photometer, Eppendorf). Als Leerwert diente 1 mL des verwendeten Mediums. Sofern eine  $OD_{600} > 1$  gemessen wurde, wurde die Kultur mit dem entsprechenden Medium verdünnt und die tatsächliche optische Dichte nach der Messung berechnet. Eine optische Dichte von 1 bei 600 nm entspricht  $1 \cdot 10^8$  Bakterien- bzw.  $1 \cdot 10^7$  Hefezellen pro Milliliter Kultur.

### 3.1.7 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von *E. coli* ermöglicht die Vermehrung von in die Zellen eingebrachten Plasmiden und erfolgte standardmäßig nach der von Dower *et al.*<sup>175</sup> beschriebenen Elektroporationsmethode. Die Generierung von elektrokompetenten Zellen geschah wie folgt: Hierfür wurden 50 mL dYT-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm inokuliert und bei 37 °C und 180 U/min kultiviert. Bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,5 wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Falconröhrchen überführt und in der Heraeus Multifuge 3L-R (4.000 U/min, 4 °C, 12 min) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet dreimal (30, 20 und 10 mL) in eiskaltem *Aqua bidest* gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet im restlichen, gesammelten Wasser des Falconröhrchens resuspendiert. Die Zellen wurden während der gesamten Zeit auf Eis gehalten. Zur Retransformation von Plasmiden wurden 3 µL des entsprechenden Plasmids und bei einer Ligation wurden 10 µL des gefällten Ligationsansatzes zusammen mit 100 µL elektrokompetenten *E. coli* Zellen verwendet in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und anschließend eine Elektroporation im *Gene Pulser*® (BioRad) bei 200 Ω, 2,5 kV, 25 µF und Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Puls wurde sofort 1 mL frisches dYT-Medium in die Küvette gegeben, die Zellen langsam resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die Inkubation des Transformationsansatzes erfolgte dann für eine Stunde bei 700 U/min und 37 °C auf dem Thermomixer (Eppendorf). Abschließend wurde ein Teil der Zellsuspension auf selektive dYT-Agar-Platten ausgestrichen und mit dem restlichen Transformationsansatz 50 mL antibiotikumhaltiges dYT-Medium beimpft.

---

### 3.1.8 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Generierung von Hefebibliotheken mit hoher Transformantenzahl wurde das Protokoll nach Benatuil *et al.* verwendet<sup>122</sup>. Hierbei wurden 1 L YPD-Medium ausgehend von einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,6 inkubiert (30 °C, 200 U/min). Anschließend wurden je 100 mL Zellsuspension nacheinander in einem 50 mL Falconröhrchen zentrifugiert (3 min, 4000 U/min, 4 °C, Heraeus Multifuge 3L-R). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 50 mL eiskaltem, sterilem Wasser und einmal mit 50 mL eiskaltem Puffer E gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 20 mL LiAc/DTT Puffer aufgenommen und für 20 min bei 30 °C und 200 U/min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet nochmals in 50 mL eiskaltem Puffer E gewaschen. Die sedimentierten, hochelektrokompetenten Hefezellen wurden unter Zugabe von Puffer E in einem Gesamtvolumen von 1 mL resuspendiert, was einer Zelldichte von  $1,6 \cdot 10^9$  Zellen/mL entspricht. Die Zellen wurden dann bis zum Zeitpunkt der Transformation auf Eis gelagert. Je Transformationsansatz wurden 400 µL Zellen, 4 µg des gereinigten Vektors und 12 µg der *insert*-DNA eingesetzt, durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit vorgekühlten Elektroporationsküvetten sowie dem *Gene Pulser*® (BioRad) bei 2,5 kV und 25 µF mit Zeitkonstanten von 3,0 bis 4,5 ms bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde jeder Transformationsansatz in 8 mL 1:1 1 M Sorbitol:YPD-Medium transferiert und für 1 h (30 °C, 200 U/min) inkubiert. Die transformierten Hefezellen wurden zentrifugiert (3 min, 4000 U/min, 4 °C) und in 10 mL SDCAA-Medium aufgenommen. Die Transformationseffizienz und der Anzahl transformierter Zellen wurden mittels Verdünnungsplattierungen aus der erhaltenen Zellsuspension ermittelt und die verbleibenden Zellen in SDCAA-Medium (10 Transformationsreaktionen/L Medium) 48 h bei 30 °C und 200 U/min kultiviert.

### 3.1.9 Oberflächenexpression von Proteinen auf *Saccharomyces cerevisiae* (Induktion)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Hefestamm EBY100 gearbeitet (2.1.2). Für die Oberflächenpräsentation von Proteinen auf *S. cerevisiae* wurde der pCT-Vektor (2.2.1), welcher einen Galactose-induzierbaren Promotor für die Fusionsproteinexpression besitzt, sowie der Hefestamm EBY100, welcher das *aga1*-Gen ebenfalls unter Kontrolle eines Gal1-Promotors im Genom trägt, verwendet. Bei der Expression und Oberflächenpräsentation von Proteinen im Fall von Einzelklonen wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 7 mL SGCAA-PEG-Medium (2.9.2) inokuliert und über Nacht (20 °C, 200 U/min) kultiviert. Die Induktion



---

der Bibliothek für die erste Sortierungsrunde erfolgt in 1 L SGCAA-PEG-Medium über Nacht bei 20 °C und 200 U/min. Um die Diversität der Bibliothek abzudecken, wurde die mindestens die zehnfache Zellzahl eingesetzt. In den anschließenden Runden erfolgte die Induktion in 50 mL SGCAA-PEG-Medium.

Außerdem wurde ein genetisch manipulierter EBY100 verwendet, bei dem die für die Oberflächenpräsentation benötigte  $\alpha$ -Agglutinin-Untereinheiten und eine Fc-Bindedomäne chromosomal kodiert unter der Kontrolle eines Galactose-induzierbaren Promotors vorliegt. Diese Bindedomäne bindet hochaffin Fc-Teile von humanen Antikörpern und diverser anderer Spezies und kann aus diesem Grund als Vermittler der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von Antikörpern und Fc-Fusionsproteinen auf Hefezellen verwendet werden. Für die Induktion wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 50 mL YPG-Medium (2.9.2) inokuliert und über Nacht (20 °C, 200 U/min) kultiviert.

## **3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **3.2.1 Sterilisation der verwendeten Geräte und Lösungen**

Die Sterilisation hitzestabiler Geräte erfolgte durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C und von hitzestabilen Lösungen für 20 min bei 121 °C (Autoklav, Systec). Hitzelabile Geräte wurden vor Gebrauch mit 70 % (v/v) Ethanol gespült und getrocknet. Von hitzelabilen Lösungen oder Puffern wurden Stammlösungen angesetzt, die vor der Verwendung durch Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 oder 0,45  $\mu$ m sterilfiltriert wurden.

### **3.2.2 DNA-Fällung mit Ammoniumacetat-Ethanol**

Diese Methode dient der Konzentration bzw. Reinigung von DNA aus salzhaltigen, wässrigen Lösungen durch Zugabe von Ethanol, was die fast vollständige Entfernung von Salzen, Proteinen und freien Nukleotiden bewirkt. Die Konzentrationserhöhung von monovalenten Kationen durch Ammoniumcarbonat führt zu einer Erhöhung der Dielektrizitätskonstante und somit zu einer verringerten Abstoßung der negativen Phosphodiestergruppen der DNA. Durch gleichzeitige Zugabe von Ethanol, das dem Ansatz Lösungsmittel entzieht, kann die DNA gefällt werden. Dafür wurde die wässrige, nukleinsäurehaltige Lösung mit 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Vol 97 % Ethanol versetzt und mindestens 1 h oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Danach erfolgte die Zentrifugation der Probe für 30 min bei 4 °C und 13.000 U/min. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen und das DNA-Pellet

---

für mindestens 30 min bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in der gewünschten Menge *Aqua bidest* aufgenommen.

### 3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Diese Methode dient der Entfernung von Proteinverunreinigungen aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung. Hierbei bildet Phenol Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten aus, so dass Protein-Nukleinsäure-Komplexe zu den freien Komponenten dissoziieren. Diese denaturierten Proteine reichern sich in der unteren Phenolphase an. Die Proteine werden ebenfalls durch Chloroform denaturiert, welches die Phasentrennung erleichtert, so dass die DNA aus der oberen, wässrigen Lösung separiert werden kann. Die wässrige, nukleinsäurehaltige Lösung wurde dazu mit 1 Vol Phenol und 2 Vol Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert (3 min, 13.000 U/min). Danach wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 Vol Chloroform, die Durchmischung der Probe und die erneute Zentrifugation. Die obere, wässrige Phase wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels Ammoniumacetat sowie Ethanol (3.2.2) gefällt.

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. 1 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und bei 64 °C bis zur Verwendung gelagert. 20 mL der Agaroselösung wurden mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt, in eine horizontalliegende Gelkammer gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) ist ein organischer Farbstoff von planarer Struktur, der sich zwischen die Basen der DNA einlagert. Die aromatischen Ringe des Ethidiumbromids interagieren dabei mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren<sup>176</sup>. Die Fluoreszenzintensität nimmt durch das Interkalieren des Ethidiumbromids in die DNA zu und die Quantenausbeute wird verstärkt<sup>177</sup>, so dass die Färbung der DNA im Agarosegel im Gegensatz zum freien Ethidiumbromid gut sichtbar ist. Nach Aushärtung des Gels erfolgten die Übersichtung mit TAE-Puffer und die Entfernung des Kamms. Die gewünschten Proben wurden mit Sucrosefarbmarker vor dem Auftragen auf das Gel versetzt. Als Längenstandard wurden 5 µL *Marker* verwendet. Es wurde ein elektrisches Feld angelegt, an dem die DNA

---

aufgrund ihrer negativen Ladung der Phosphodiestergruppen in Richtung der Anode aufgetrennt wird. Die Elektrophorese erfolgte hier bei einer gleichbleibenden Spannung von 110 V für 30 bis 50 min. Danach konnte die DNA mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm betrachtet (Gel Jet Imager) und fotografiert oder die jeweiligen DNA-Banden zur Reinigung aus dem Gel extrahiert werden.

### 3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen lässt sich durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmen. Gemessen wurde im Spektralphotometer (UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu) gegen Wasser in einer Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm). Hierbei entsprach eine OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA, 35 µg/mL RNA oder 33 µg/mL ssDNA. Außerdem können durch eine zweite Messung bei 280 nm Rückschlüsse auf die Reinheit der nukleinsäurehaltigen Lösung getroffen werden. Entspricht das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> einem Wert von 2, ist die Probe proteinfrei. Werte < 2 zeigen an, in welchem Maße die Lösung verunreinigt ist.

### 3.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR Ansätzen mittels *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit* (Promega)

Zur Isolierung und Reinigung von über Gelelektrophorese aufgetrennter DNA wurde das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit* von Promega verwendet. Hierfür wurde die DNA mittels Skalpell aus dem Gel extrahiert und in ein 2 mL Eppendorfgefäß transferiert. Die Extraktion der DNA wurde anschließend nach der Beschreibung und mit den mitgelieferten Puffern des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

#### 3.2.7.1 Isolierung analytischer Mengen von Plasmid-DNA mit dem *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Kit* (Promega)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit* von Promega. Die Basis des Systems ist die alkalische Lyse von Bakterienzellen. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach der Beschreibung und mit den

---

mitgelieferten Puffern vom Hersteller durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.7.2 Isolierung präparativer Mengen von Plasmid-DNA mit dem *Pure Yield® Plasmid Midiprep System-Kit* (Promega)**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im präparativen Maßstab wurde mittels *PureYield® Plasmid Midiprep System* der Firma Promega durchgeführt, welches ebenfalls auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen basiert. Es wurden die mitgelieferten Puffer unter Verwendung der Herstellerangaben verwendet. Die erhaltene DNA-Lösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Für die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus Hefen wurden 2 mL einer Übernachtskultur sedimentiert (3 min, 13.000 U/min). Danach wurde das Zellpellet in 200 µL Hefe-Lysispuffer aufgenommen und der Suspension wurden 1 Vol Phenol sowie 2 Vol Chloroform zugesetzt. Durch kräftiges Vortexen und Schütteln (30 min, 800 U/min) der Suspension wurden die Hefezellen aufgeschlossen und alle unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol Chloroform vermischt und zentrifugiert (3 min, 13.000 U/min). Die wässrige, obere Phase wurde erneut in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit Ammoniumacetat sowie Ethanol, wie in 3.2.2 beschrieben, gefällt.

#### **3.2.9 Sucroседichtegradientenzentrifugation**

Diese Methode wurde zur Reinigung von linearisierter Plasmid-DNA verwendet, welche für die Erstellung von Bibliotheken hochrein und in großen Mengen vorliegen musste. Durch eine Dichtezentrifugation mit einem kontinuierlichen Sucrose-Gradienten konnten DNA-Fragmente mit verschiedenen Größen aufgetrennt werden. Zur Gradienten-Herstellung in den Ultrazentrifugen-Röhrchen (*Open Top Polyclear™ Centrifuge Tube*) wurden eine Mischkammer und drei Sucrose-Lösungen mit 10, 30 und 40 % Sucrose verwendet. Danach wurden bis zu 200 µg DNA auf diesen Gradienten gegeben, mit Paraffinöl überschichtet und austariert. Die Röhrchen wurden anschließend im Vakuum für 21 h bei 30.000 U/min (Schwenkbecherrotor SW41TI, Beckman-Optima™ LE- 80K Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation

---

wurden die Röhrchen mit Hilfe einer Kanüle punktiert, jeweils 500  $\mu$ L Fraktionen gesammelt und anhand einer Agarosegelelektrophorese (3.2.4) analysiert. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ammoniumacetat sowie Ethanol (3.2.2) gefällt.

### 3.3 Enzymatische Arbeitsmethoden

#### 3.3.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche spezifische Sequenzen auf der DNA erkennen und hydrolytisch spalten. Ihre Bezeichnung ist abhängig vom jeweiligen Ursprungsorganismus. Der erste Buchstabe gibt die Gattung an, während der zweite und dritte Buchstabe die Art angibt. Die nachfolgenden Buchstaben oder Zahlen sagen etwas über die chronologische Reihenfolge der Entdeckung<sup>178</sup>. In der Molekularbiologie werden am häufigsten Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Diese sind ATP unabhängig und spalten die DNA in einer meist sechs bis acht bp langen palindromischen Erkennungssequenz. Je nach Enzym werden verschiedene DNA-Enden generiert. Dies können *sticky ends* (Überhänge am 3'- und 5'- Ende der DNA) oder *blunt ends* (ohne Überhänge) sein. *Sticky ends* sind von Vorteil bei der Ligation von DNA-Fragmenten, da sich diese spezifisch durch ihre zwei zueinander kompatiblen Endstücke dauerhaft zu einem stabilen Doppelstrang ligieren lassen.

Die Plasmid-DNA wurde unter den laut Hersteller (MBI Fermentas, New England Biolabs) optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Bei Verwendung von mehreren Enzymen in einem Spaltansatz wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass die Enzyme mit einer Effizienz von 50 bis 100 % arbeiteten. In der Regel wurde die DNA in einer Endkonzentration von 100 ng/ $\mu$ L zusammen mit ein bis zwei Units Restriktionsenzym pro  $\mu$ g DNA eingesetzt und inkubiert. Der Verdau von analytischen Spaltungen erfolgte für eine Stunde und von DNA für Klonierungen zum Teil über Nacht. Nach der Spaltung wurde die nukleinsäurehaltige Probe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.3) oder Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt.

#### 3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation der gespaltenen DNA-Fragmente wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, welche die energieverbrauchende Verknüpfung der komplementären DNA-Stränge katalysiert, wobei ein Phosphatrest des einen mit der Desoxyribose des anderen Stranges über eine Esterbindung

---

verbunden wird. ATP dient hierbei als Energieträger und ist dem Puffer beigemischt. Die Ligation erfolgte mit einem bis zu fünffach molaren Überschuss an *insert*-Fragment gegenüber dem Vektor-Fragment. In einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$  wurde die Reaktion unter Zusatz von 2  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase-Puffer und 1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation wurde über Nacht im Kühlschrank durchgeführt und vor der Transformation mit *E. coli* mittels Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (3.2.2).

### 3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro* durchführbare Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten<sup>179-181</sup>. Sie ähnelt dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation und ermöglicht die Manipulationen an DNA-Fragmenten. Die DNA-Polymerase synthetisiert die neuen DNA-Stränge. Mit Hilfe von definierten Startermolekülen, sogenannte Primern, wird aus einem DNA-Gemisch selektiv eine gewünschte DNA-Matrize (*template*) vervielfacht. Der PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung bei 96 °C, wobei die doppelsträngige DNA-Matrize in einzelsträngige DNA überführt wird. In der *annealing*-Phase hybridisieren die beiden verwendeten Primer am vorgesehenen 5'-Ende bei 52 °C an den DNA-Einzelsträngen. Danach wird in der Elongationsphase mittels DNA-Polymerase bei 72 °C ein DNA-Doppeltrang in Richtung des 3'-Einzelstranges gebildet. Diese drei Zyklusschritte werden insgesamt 30 bis 35 Mal wiederholt, so dass das *template* exponentiell vervielfältigt wird. Die PCR-Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{L}$  in *Multiply*<sup>®</sup>- $\mu\text{Strip}$  PCR-Gefäßen (Sarstedt) statt. Es wurden 5 bis 100 ng Matrizen-DNA, sowie 5  $\mu\text{L}$  10-fach *Taq*-Puffer, 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 nM Endkonzentration), je 1  $\mu\text{L}$  (10 pmol) beider Oligonukleotid-Primer, 41  $\mu\text{L}$  *Aqua bidest* und 1  $\mu\text{L}$  *Taq*-Polymerase eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet, um die Reaktionslösung vor dem Verdampfen zu schützen. Zeitspanne und Temperatur der PCR-Reaktionen wurden abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, der Länge der Oligonukleotid-Primer und dem G/C-Gehalt des *templates* gewählt. Die Elongationszeit beträgt etwa 1 min/1000 bp und wird bei einer Temperatur von 72 °C durchgeführt. Die Schmelztemperatur  $T_M$  eines Primers kann anhand folgender empirischer Formel (1) errechnet werden, welche den G/C-Gehalt ( $\% \frac{G}{C}$ ) sowie die Basenlänge des Primers (n) berücksichtigt:

$$T_M[^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times \left( \% \frac{G}{C} \right) - \frac{650}{n} \quad (1)$$

---

Die optimale *annealing*-Temperatur  $T_A$  der jeweiligen PCR-Reaktion kann anhand Formel (2) bestimmt werden:

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2)$$

$T_{M1}$  und  $T_{M2}$  stehen hierbei für die Schmelztemperatur der beiden Primer. Die Denaturierung des *templates* zu Beginn erfolgte bei 96 °C für 3 min und die zyklische Denaturierung bei 96 °C für 30 s. Das *annealing* erfolgte bei 52 °C für 30 s, die Elongation bei 72 °C für 30 bis 120 s je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

### 3.3.4 Kolonie-PCR

#### 3.3.4.1 Kolonie-PCR von *Escherichia coli*

Diese Methode diente der Durchmusterung einzelner Bakterienkolonien nach einem gewünschten DNA-Abschnitt. Der PCR-Reaktion wird ein Denaturierungsschritt bei 98 °C für 5 min vorangesetzt, der dem Aufschluss der Bakterien sowie der Denaturierung der darin enthaltenen Proteine dient. Die Temperaturen und Zeitspannen der PCR-Reaktionsschritte wurden dabei, wie in 3.3.3 beschrieben, gewählt. Die Kolonie-PCR wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4) analysiert. In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µL 10-fach *Taq*-Puffer, 1 µL dNTPs (10 nM Endkonzentration), je 1 µL (10 pmol) beider Oligonukleotid-Primer und 40 µL *Aqua bidest* gegeben. Die *E. coli* Einzelklone wurden mittels steriler Pipettenspitze von der Agar-Platte gepickt, auf eine dYT-Agar-Masterplatte übertragen und anschließend dem Reaktionsansatz im PCR-Reaktionsgefäß zugeführt. Danach erfolgte die Beschichtung des Reaktionsansatzes mit Paraffinöl, welcher anschließend für 5 min bei 98 °C erhitzt wurde. Erst nach dem Aufkochen der *E. coli* Zellen wurde 2 µL der Haus-*Taq*-Polymerase zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. Nun folgte das normale PCR-Protokoll, wie in 3.3.3 beschrieben.

#### 3.3.4.2 Kolonie-PCR von *Saccharomyces cerevisiae*

Diese Methode diente der Durchmusterung einzelner Hefekolonien nach einem gewünschten DNA-Abschnitt. Hierfür wurden die *S. cerevisiae* Einzelklone mittels steriler Pipettenspitze von der Agar-Platte gepickt, auf eine SDCAA-Agar-Masterplatte übertragen und anschließend dem PCR-Reaktionsgefäß zugeführt, welches 10 µL Puffer S und 5 µL *yeast lytic enzyme* enthielt. Das *yeast lytic enzyme*, auch Zymolyase genannt, dient der enzymatischen Lyse der Hefezellen und zerstört die Glucan-Zellwand<sup>182</sup>. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 30 °C und

---

anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße (ohne Beschichtung) 10 min bei 98 °C aufgeköcht. In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µL 10-fach *Taq*-Puffer, 1 µL dNTPs (10 nM Endkonzentration), je 1 µL (10 pmol) beider Oligonukleotid-Primer, 40 µL *Aqua bidest* und 2 µL Haus-*Taq*-Polymerase gegeben. Danach erfolgten die Beschichtung des Reaktionsansatzes mit Paraffinöl und die Reaktion in der PCR-Maschine. Die Temperaturen und Zeitspannen der PCR-Reaktionsschritte wurden dabei, wie in 3.3.3 beschrieben, gewählt. Die Kolonie-PCR wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4) analysiert.

### 3.3.5 <sup>3</sup>CARD-System

Das <sup>3</sup>CARD (*triple catalytic reporter deposition*)-System ist eine auf dem *phage display* basierende Methode, welche zur schnelleren Isolierung von Bindemolekülen genutzt wird<sup>183</sup>. Durch die Kombination dreier Enzyme - einer Peroxidase, einer Oxidase und einer Katalase - kommt es zu einer kovalenten Markierung der Zielprotein-bindenden Phagen mit Biotintyramid, so dass diese Phagen durch magnetische Streptavidin-*beads* aus einer Lösung mit nicht-bindenden Phagen isoliert werden können.

#### 3.3.5.1 Oxidation von Proteinen mittels Natriumperiodat

Natriumperiodat ist in der Lage Glycole (1,2-Diole) zu oxidieren und somit zwei Carbonylgruppen zu generieren<sup>184</sup>, welche in der Lage sind mit Aminogruppen von Aminosäuren über Bildung einer Schiff'schen Base zu reagieren. Oxidiert man glykosylierte Proteine mit Natriumperiodat, dann können diese mit anderen Proteinen oder mikrobiellen Oberflächen (z.B. Phagen) reagieren und es wird eine permanente Verknüpfung der beiden Reaktionspartner generiert. Für die Oxidation von Proteinen wurde eine Natriumperiodat-Lösung von 18,8 mg/mL (8,8 µmol) hergestellt und 200 µL Proteinlösung (10 mg/mL) mit  $\frac{1}{10}$  dieser Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Lösung über eine PD-10 Säule (GE Healthcare) gereinigt. Bei der Oxidation von HRP wurde die Säule mit Borat-Puffer pH 9,1 äquilibriert und die oxidierte HRP in 200 µL Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei der Oxidation der Glucose-Oxidase (GOX) wurde anschließend die Konzentration mittels Photometer bestimmt, um entsprechende Mengen zur Kopplung mit CTLA-4 zu verwenden.



---

### 3.3.5.2 Generierung des GOX-CTLA-4-Konjugats

Die Oxidation der Glucose-Oxidase (GOX) wurde, wie in Methode 3.3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden für die Kopplungsreaktion 125  $\mu\text{L}$  (25 mg/mL) CTLA-4-Ig mit 450  $\mu\text{L}$  (10 mg/mL) oxidiert GOX gemischt, was einem vierfach molaren Überschuss von Glucose-Oxidase entspricht. Es wurden 10  $\mu\text{L}$  Cyanoborhydrid (5 M in NaOH) hinzugegeben, welches die Schiff'sche Base spezifisch zu einer Amin-Bindung umsetzt. Die Kopplungsreaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss stehend inkubiert. Anschließend wurden die noch freien Aldehyd-Gruppen mittels 10  $\mu\text{L}$  Ethanolamin (3 M) abreagiert und das resultierende Konjugat über Nacht gegen 5 L PBS dialysiert (3.4.4). Am nächsten Tag wurde das CTLA-4-GOX-Konjugat mittels GFC (Superdex 200 pg 16/60 GE Healthcare) gereinigt und die entsprechenden Fraktionen gesammelt (3.4.9.3). Der Nachweis des Konjugats in den gesammelten Fraktionen geschah über ABTS-Enzymaktivitätstest (GOX, 3.3.8) und ELISA (CTLA-4-Ig, 3.3.6). Die entsprechenden Fraktionen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C eingelagert (3.4.11).

### 3.3.5.3 Biotintyramidmarkierung von Phagen mittels <sup>3</sup>CARD System

100  $\mu\text{L}$  Phagen (ca.  $1 \cdot 10^{13}$ ), welche die oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek auf der Oberfläche präsentierten, wurden 45 min mit 10  $\mu\text{L}$  Streptavidin *Dynabeads*<sup>®</sup> T1 bei 4 °C in einem Überkopfrötierer (40 U/min) inkubiert. Somit sollte gegen Streptavidin-bindende Varianten vorselektiert werden. Die *beads* wurden mittels Magnetständer von den Phagen separiert, die restlichen Phagen mit dem gleichen Volumen an oxidiert HRP (3.5.1) versetzt und für 45 min bei RT unter Lichtausschluss auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach folgte die Phagen-Fällung über Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Phagen-Fällungspuffer und Inkubation auf Eis für 45 min. Nach Sedimentation der Phagen (13.200 U/min, 20 min, 4 °C) und Resuspension in 50  $\mu\text{L}$  PBS, wurden 10  $\mu\text{L}$  (0,01 mg/mL) des CTLA-4-GOX-Konjugates zur Interaktion zugegeben, was für 45 min bei 800 U/min und RT inkubiert wurde. Für die folgende Biotintyramid-Reaktion wurde das Reaktionsvolumen auf 500  $\mu\text{L}$  mit PBS aufgefüllt und 1  $\mu\text{L}$  Katalase (2 mg/mL), 2,5  $\mu\text{L}$  S-S-Biotintyramid (11,5  $\mu\text{M}$ ) und 10  $\mu\text{L}$  Glucose (1 M) zugegeben. Nach dem Durchmischen der Lösung wurde die Reaktion für 15 min stehend im Dunkeln durchgeführt. Es folgte die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  (2 mg/mL) Katalase für 1 min bei RT, um die Reaktion abzustoppen. Dann wurden 700  $\mu\text{L}$  Phagenfällungspuffer zugegeben, für 45 min auf Eis inkubiert und sedimentiert (30 min, 13.200 U/min, 4 °C). Das Pellet wurde in 200  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert, 20  $\mu\text{L}$  Streptavidin *Dynabeads*<sup>®</sup> T1 zugegeben und 30 min bei RT auf

---

dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend folgten fünf Waschschrte mit jeweils 200  $\mu$ L PBS, die *beads* wurden danach in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß transferiert und nach Zugabe von 200  $\mu$ L Glycin (0,2 mM) pH 2,2 für 8 min stehend bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal mit Glycin pH 2,2 (200  $\mu$ L) und fünfmal mit TPBS (200  $\mu$ L) gewaschen, und die Phagen erneut in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die *beads* wurden weitere fünfmal mit PBS (200  $\mu$ L) nochmal gewaschen und anschließend für 5 min mit 50 mM DTT in PBS (200  $\mu$ L) inkubiert, was zur Disulfidbrückenreduktion im S-S-Biotintyramid führt und somit die Phagen von den magnetischen *beads* trennt. Die 200  $\mu$ L eluierten Phagen wurden für die Infektion von 25 mL ER2738 *E. coli* Zellen ( $OD_{600} = 0,4$ ) eingesetzt. Die Infektion erfolgte stehend bei 37 °C für 30 min. Nach Sedimentation der Zellen (20 min, 4000 U/min, Heraeus Multifuge) wurden die Zellen in 1,5 mL PBS resuspendiert und auf selektiven dYT-Agar-Platten ausgestrichen. Zur Feststellung des Phagentiters wurden nach der HRP-Kopplung (1. Phagentiter) und nach der Infektion (2. Phagentiter) sequenzielle Verdünnungen mit selektiven dYT-Agar-Platten durchgeführt.

### 3.3.6 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Diese Methode ist ein Antikörper-basierendes Nachweisverfahren und wurde erstmals durch Engvall und Perlman 1971 genannt<sup>185</sup>. Hierbei werden die benötigten Kavitäten einer Maxisorp Mikrotiterplatte (Nunc) mit dem jeweiligen Antigen beschichtet, anschließend folgt ein *blocking*-Schritt (Milchpulver oder BSA in PBS), um ungebundene Stellen zu blockieren und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Anschließend wird der Antikörper oder das Antigen-bindende Molekül hinzugegeben, für die indirekte Detektion erfolgt danach ein Inkubationsschritt mit dem sekundären, konjugierten Antikörper. Die Zugabe eines Substrats führt zu einer Farbreaktion, die nach Abstoppen mittels ELISA-Reader analysiert werden kann. Die Beschichtung der Maxisorp-Platte erfolgte idealerweise mit 2 bis 10  $\mu$ g Protein/Kavität über Nacht im Kühlschrank. Hauptsächlich wurden ExtrAvidin-HRP (Sigma Aldrich) und anti-Human-HRP (Antikörper-Online) als Sekundärantikörper verwendet. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten mehrere automatisierte Waschschrte (Mikrotiterplatten-Wascher, HydroFlex) der Kavitäten mittels PBS, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Als Substrat für die Meerrettichperoxidase (HRP) diente das Chromogen 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Die Enzymreaktion wurde durch 1 % HCl-Lösung abgestoppt und die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm.

---

### 3.3.7 Phagen-ELISA

Diese Methode wird verwendet, um die Bindungseigenschaften von Proteinen, welche auf der Phagenoberfläche präsentiert vorliegen, zu überprüfen. Der Vorteil daran ist, dass Anreicherungsrunten bzw. Einzelklone ohne eine vorherige lösliche Produktion auf ihre potenzielle Bindungseigenschaft analysiert werden können. Die jeweiligen Kavitäten (Maxisorp Mikrotiterplatte, Nunc) wurden mit 50  $\mu\text{L}$  Proteinlösung (2 bis 10  $\mu\text{g}$  Protein in PBS/Kavität) beladen und nach 30 min schütteln (Titramax 1000, 800 U/min bei RT) über Nacht bei 4 °C stehend inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung entfernt und die Kavitäten mit je 200  $\mu\text{L}$  3 % (w/v) BSA in PBS für 1 h bei 800 U/min und RT geblockt, um die unspezifischen Hintergrundsignale, verursacht durch unspezifisch bindende Phagen, zu minimieren. Nach dem zehnmaligen, automatisierten Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Kavitäten mit den Phagen. Dafür wurden die Phagensuspensionen in 1 % (w/v) BSA in PBS auf eine Konzentration von  $10^{10}$  Phagen eingestellt und davon 50  $\mu\text{L}$ /Kavität eingesetzt. Nach einer 90 minütigen Inkubation (800 U/min, RT) erfolgte das automatisierte Waschen (zehnmal mit PBS). Gebundene Phagen wurden durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  des anti-pVIII-HRP-Antikörpers (1:5000, in 1 % BSA in PBS) markiert. Dafür wurde die Platte bei 800 U/min 90 min bei RT und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zehnmaligem, automatischem Waschen mit PBS wurde die TMB-Lösung (1:1 TMB mit Wasser) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 15 bis 30 min mit 1 % HCl-Lösung abgestoppt und die nun gelbe Lösung wurde im ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

### 3.3.8 Enzymatischer Aktivitätstest von Oxidasen mittels ABTS

Zum Nachweis von aktiven Oxidasen wurde ein gekoppeltes System aus Oxidase, ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) und Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. ABTS ist ein sehr sensitives Chromogen<sup>186, 187</sup> und wird während des Umsatzes von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durch eine *catalase-like reaction*<sup>188</sup> der HRP zu zwei stabilen ABTS-Radikalen gespalten. Die Grünfärbung der Reaktionslösung wird bei einer Absorptionswellenlänge von 405 nm im Spektralphotometer bzw. ELISA-Reader gemessen. Bei der Analyse der Konjugation von Glucose-Oxidase (GOX) an CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) wurden 150  $\mu\text{L}$  ABTS, 150  $\mu\text{L}$  1 M Glucose und 50  $\mu\text{L}$  HRP auf 3 mL mit PBS aufgefüllt, und davon 50  $\mu\text{L}$  mit 75  $\mu\text{L}$  zu analysierender GFC-Fraktion pro Mikrotiterplatten-Kavität inkubiert und anschließend im ELISA-Reader vermessen.

---

## 3.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

### 3.4.1 Expression von Miniproteinen in *Escherichia coli*

Hierfür wurden elektrokompente *E. coli* Shuffle T7 Zellen (2.1.1) mit dem Plasmid pET-32K transformiert (2.2.3), mit dem verschiedene Miniproteinvarianten als Thioredoxin-Fusion produziert wurden. Einzelklone wurden auf ampicillinhaltigen dYT-Agar-Platten selektiert. Für die Expression der Fusionsproteine 1 L selektives dYT-Medium mit Hilfe einer Übernachtskultur eines Einzelklons auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und bei 180 U/min sowie 37 °C kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 mit 1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei 25 °C sowie 180 U/min über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension sedimentiert (4.000 U/min, 30 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20 mL PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.4.2 Zellaufschluss mittels *French-Press*

Um die Proteine aus den Zellen zu isolieren, wurde eine Gesamtzelllyse per *French-Press*<sup>®</sup> durchgeführt. Hierfür wurden die geernteten Zellen nach dem Auftauen verwendet und anschließend unter hohem Druck durch ein enges Ventil gepresst, wodurch beim Passieren des Ventils durch den abfallenden Druck Scherkräfte entstehen, wodurch die Zellen platzen<sup>189</sup>. Die Zellsuspension wurde in die gekühlte Bombe eingefüllt, welche im hydraulischen Hebearm der *French-Press*<sup>®</sup> arretiert wurde. Der Druck, der auf die Zellen wirkte, betrug 1.200 psig (ca. 8,3 MPa). Die Zellsuspension wurde tröpfchenweise aus der Bombe gelassen, was manuell mit dem Auslassventil erfolgte. Eine Probe wurde zwei- bis dreimal durch die *French-Press*<sup>®</sup> geschickt. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 min bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert, wobei sich Zelltrümmer, Organellen, etc. im Pellet sammelten. Die löslichen Proteine befanden sich im Überstand und dieser wurde sterilfiltriert (0,45 μm). Die Proteinlösung wurde die ganze Zeit über auf Eis gelagert und zeitnah weiterverarbeitet, um die Proteine vor dem Abbau durch Proteinasen so gut wie möglich zu schützen.

### 3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode bedient man sich der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli<sup>190</sup>. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrer

Größe nach aufgetrennt und analysiert werden können. Als Detergens wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, welches anionisch ist und die nichtkovalenten Bindungen der Proteine unterbricht, indem es ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zum Teil auflöst. Dabei maskiert Natriumdodecylsulfat effektiv die Eigenladung von Proteinen, da sich bis zu 1,4 g SDS an 1 g Protein anlagert und somit durch die anionischen Sulfatgruppen eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht entsteht. Der verwendete *HOECHST*-Puffer enthält Dithiothreitol (DTT) und Harnstoff, um die Disulfidbrücken der Proteine zu reduzieren. In einer radikalischen Reaktion polymerisiert Acrylamid nach Zugabe eines Radikalstarters mit Bisacrylamid unter Luftausschluss zu chemisch inertem Polyacrylamidgel. Es wurden Laemmli-Gele mit 15 % Acrylamid verwendet. In einem Giesstand (*Multiple Gel Caster*, Hoefer™) könnten fünf bzw. zehn Gele gleichzeitig hergestellt werden. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels der Laemmli-Gele zeigen Tab. 3.1 und 3.2.

**Tab. 3.1** Zusammensetzung des Trenngels nach Laemmli.

Chemikalien	Trenngel
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	16,8 mL
Trenngelpuffer	8 mL
Aqua bidest	6,8 mL
75 % (w/v) Glycerin	8 mL
10 % (w/v) APS	200 µL
TEMED	40 µL

**Tab. 3.2** Zusammensetzung des Sammelgels nach Laemmli.

Chemikalien	Sammelgel
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2,8 mL
Sammelgel-Puffer	5,2 mL
Aqua bidest	8 mL
75 % (w/v) Glycerin	4 mL
10 % (w/v) APS	160 µL
TEMED	40 µL

Die verwendeten Proben wurden mit  $\frac{1}{5}$  Vol *HOECHST*-Puffer versetzt, für 10 min auf einem 98 °C-Heizblock erhitzt und danach bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Die Polyacrylamidgele wurden in die Elektrophoreseapparatur (*Dual Gel Caster*, Hoefer™)

---

gespannt. Diese Apparatur wurde mit 1-fach Laemmli-Puffer befüllt, der Taschenkamm entfernt, eine Tasche mit Protein-Marker und die anderen mit den Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA und maximal 200 V. Coomassie-Brillant-Blue-R-250 wurde zur Visualisierung der Banden eines Polyacrylamidgels verwendet. Dieser Triphenylmethanfarbstoff bildet durch seine Sulfonat-Gruppen ionische Wechselwirkungen mit den nichtpolaren und kationischen Aminosäure-Seitenketten der Proteine<sup>191</sup>. Das Polyacrylamidgel wurde in eine Schale mit einer 1:1 Mischung aus Coomassie-Farbelösung und 20 % Essigsäure für 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel mit Wasser gewaschen, zum Entfärben komplett mit Wasser bedeckt, 5 bis 10 min in der Mikrowelle aufgeköcht und abschließend dokumentiert.

#### 3.4.4 Dialyse von Proteinen

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Diffusion von Teilchen an einer semipermeablen Membran, wobei der Puffer ausgetauscht und die Proteinlösung von Fremdstoffen, wie kleinen Peptiden, befreit werden kann. Dafür wird die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt, sorgfältig verschlossen und in Puffer inkubiert. Der verwendete Dialyseschlauch hat eine selektive Ausschlussgröße (MWCO-Wert, *molecular weight cut off*). Dieser Wert gibt das relative Molekulargewicht der Teilchen an, die zu mindestens 90 % von der Membran zurückgehalten werden. Kleinere Moleküle können die Membran passieren. Die Proteinlösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, über Nacht bei 4 °C gegen 3 bis 5 L PBS dialysiert. Es wurden Dialyseschläuche der Firma Roth verwendet.

#### 3.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels photometrischer Messung

Die Proteinkonzentrationen von wässrigen Lösungen wurden über Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe, geringer Anteil) und Cysteine (Cys), die über Disulfidbrücken verknüpft sind. 1995 wurde von Pace *et al.* eine Formel zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten eines Proteins entwickelt<sup>192</sup>. Aus einer gemessenen Absorption bei 280 nm kann nun mit Hilfe der folgenden Formel (3) und des Lambert-Beer'schen Gesetzes, die enthaltene Proteinmenge ermittelt werden:

$$A(280) \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\# \text{Trp} \times 5500) + (\# \text{Tyr} \times 1490) + (\# \text{Cys} \times 125) \quad (3)$$

---

# steht für die Anzahl der Aminosäuren bzw. Disulfidbrücken in dem entsprechenden Protein. Die Absorptionsmessungen wurden mit dem Spektralphotometer (Shimadzu) oder Bio-Spec Nano (Shimadzu) durchgeführt.

### **3.4.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen**

#### **3.4.6.1 Biotinylierung von Proteinen**

Mit der Biotinylierung ist es möglich, Proteine spezifisch mit Biotin-Molekülen zu konjugieren. Avidin und Streptavidin binden außerordentlich hochaffin an Biotin, so dass biotinylierte Proteine mittels Avidin beschichteter Partikel aus Proteinlösungen isoliert werden können. Es ist außerdem möglich, spezifisch Biotin-markierte Proteine auf Oberflächen durch Konjugate bestehend aus Fluoreszenzfarbstoff und Streptavidin nachzuweisen<sup>193</sup>. Frei zugängliche Aminogruppen (*N*-Terminus von Proteinen und Seitenkette von Lysin) bilden durch die Reaktion mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien) eine neue Amid-Bindung aus. Hierbei wird das Sulfo-NHS-LC-Biotin im fünf- bis zehnfachem molaren Überschuss eingesetzt. Dafür wurde das Sulfo-NHS-LC-Biotin (1 mg/mL) in PBS gelöst sowie die entsprechende Menge zu dem gewünschten Protein (z.B. 25 mg/mL CTLA-4-Ig) hinzugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Das überschüssige Biotin sowie die Sulfo-NHS-Abgangsgruppen wurden nach der Reaktion über einer PD-10 Säule abgetrennt, welche eine Art Größenausschlusschromatographie darstellt. Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels HABA/Avidin Test überprüft<sup>194</sup>. Die Reinigung über eine PD-10 Säule und der HABA/Avidin Test wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Biotin-markierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.6.2 FITC-Markierung von Proteinen**

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und gehört zur Gruppe der Xanthen Farbstoffe. FITC kann zur Markierung verschiedener Proteine verwendet werden, so dass es möglich ist, diese Proteine spezifisch auf einer Oberfläche z.B. durch Durchflusszytometrie nachzuweisen. Bei der Reaktion wird 40 bis 80 µg FITC (Roth) pro 1 mg Protein eingesetzt. Dafür wird FITC in DMSO gelöst und der Reaktion mit dem gewünschten Protein wird in Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5) für 1 h schüttelnd bei RT und unter Lichtausschluss inkubiert. Das überschüssige FITC wurde nach der Reaktion über einer PD-10 Säule abgetrennt, welche eine Art Größenausschlusschromatographie darstellt. Die FITC-markierten Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.



---

### 3.4.7 Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

Die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) mit ihrem Konzept, Peptide während ihrer Synthese an feste Polymere zu koppeln, wurde 1963 von Mojsov und Merrifield eingeführt<sup>195</sup>. Diese Immobilisierung macht es möglich, mit großen Überschüssen zu arbeiten und verwendete Reagenzien schnell zu entfernen, was zu einer größeren Ausbeute führt. AmphiSpheres 40 RAM 0,4 mmol/g 75-150  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies) wurde als Syntheseharz für die Assemblierung der synthetischen MC-CT-010 Variante verwendet und für die Peptidsynthese wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren am CEM Liberty<sup>®</sup> Peptidsynthesizer eingesetzt, so dass die *N*- $\alpha$ -Aminogruppen sowie die funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren durch orthogonale Schutzgruppen abgeschirmt wurden und nur durch spezifische Abspaltungsbedingungen entschützt werden konnten<sup>196</sup>. Durch Abspaltung der *N*- $\alpha$ -amino Schutzgruppe und Kopplung einer weiteren Aminosäure wird das Peptid in Richtung *N*-Terminus verlängert. Der Zyklus aus Kopplung und Entschützung wird mehrmals wiederholt, so dass die lineare Vorstufe des Peptids synthetisiert wird. Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden durch Waschen nach jedem Schritt entfernt. Durch Azidolyse vom Harz wird das Peptid unter Verlust der Schutzgruppen hydrolysiert werden und liegt dann je nach Eigenschaft des verwendeten Linkers nach Abspaltung mit Säure-, Amid- oder anderer *C*-terminaler Funktionalität vor.

Für die Synthese eines Miniproteins wurde der Synthesizer, bestückt mit den benötigten Reagenzien sowie Lösungsmitteln, programmiert. Vor Synthesebeginn erfolgte das Quellen des Harzes für 1 h in DMF und 1 h in DCM bei RT unter Schütteln. Nach vollständiger Synthese im Gerät erfolgte die manuelle *N*-terminale Biotin-Kopplung (4 Äq Biotin, 3,9 Äq HBTU und 8 Äq DIEA in DMF). Das Harz wurde anschließend mehrmals mit DMF, DCM sowie Diethylether gewaschen und im Exsikkator getrocknet sowie gelagert. Die Peptid-Abspaltung vom Harz durch Zugabe von 94 % (v/v) TFA, 2 % (v/v) H<sub>2</sub>O, 2 % (m/v) DTT, 1 % (v/v) Triethylsilan und 1 % (v/v) Anisol. Nach der Peptid-Fällung in MTBE wurde das Pellet in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (2:8, v/v) aufgenommen, lyophilisiert und *via* RP-HPLC sowie LC-MS analysiert.

### 3.4.8 Oxidative Faltung der synthetisierten Miniproteinvarianten

Nach Abspaltung vom Syntheseharz lag das synthetisierte Miniprotein als lineares Peptid vor. Für die Ausbildung von Sekundär- sowie Tertiärstruktur ( $\beta$ -Faltblätter, Disulfidbrücken) und der damit verbundenen biologischen Aktivität wurde das Peptid in ein hierfür entwickeltes



---

Faltungssystem überführt<sup>45</sup>. Das Peptid wurde im Faltungspuffer (10 % v/v DMSO, 10 % (v/v) TFE, 1 M Gu-HCl, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7) gelöst und für 1-7 d bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde durch direktes Einspritzen in eine RP-HPLC oder LC-ESI-MS abgestoppt und analysiert. Die Aufarbeitung der Faltungsprodukte erfolgte dann mittels semi-präparativer HPLC (3.4.9.2).

### 3.4.9 Chromatographie

#### 3.4.9.1 *Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography (IMAC)*

Dieses chromatographische Trennverfahren wird zur Reinigung von Proteinen verwendet<sup>197</sup>. Als Säulenmatrix wurde *Chelating Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare) verwendet, was an der Matrixoberfläche Nitrilotriessigsäuremoleküle (NTA) präsentiert. NTA ist ein Metallchelator, der in der Lage ist multivalente Metallionen, wie beispielsweise  $\text{Ni}_2^+$ , zu binden<sup>198, 199</sup>. Die Proteine, die gereinigt werden, besitzen rekombinant entweder am C- oder N-terminalen Ende eine kurze Aminosäuresequenz aus sechs Histidinen (His-tag). Dieser His-tag bindet an die auf der Säule komplexierten  $\text{Ni}_2^+$ -Ionen, so dass die Proteine an der Matrix immobilisiert werden. Über Ligandenaustausch durch einen steigenden Imidazol-Gradienten können die Proteine von der Säule eluiert werden. Vor Beginn der Reinigung wurde die Säule über Zugabe von 10 mL 100 mM  $\text{NiCl}_2$ -Lösung mit Nickelkationen beladen. Danach folgten zwei Waschschrte mit je 10 mL *Aqua bidest* und ein Kalibrierungsschritt der Säule mit 10 mL PBS, bevor die Proteinlösung auf die Säule gegeben und die Fraktionen in einzelnen Falconröhrchen aufgefangen wurden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen steigenden Imidazol-Gradienten (20, 40, 60, 100, 200, 500 mM Imidazol in PBS, je 10 mL). Anschließend wurde das Nickel mit 10 mL 100 mM EDTA von der Säule gewaschen und die Säule durch zweimaliges Spülen mit *Aqua bidest* regeneriert. Die Lagerung der gesammelten Fraktionen geschah bei 4 °C.

#### 3.4.9.2 *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)*

Die *reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie und stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probe mittels einer flüssigen Phase unter hohem Druck über die stationäre Phase, die Trennsäule, transportiert wird. Die Substanzen werden auf Grund unterschiedlicher Hydrophobizität aufgetrennt. Die Detektion der eluierten Moleküle erfolgte optisch durch einen UV-Detektor (zwei verschiedene Wellenlängen, 220 nm und 280 nm), so dass die eluierten Moleküle

---

manuell gesammelt werden konnten. Die analytische RP-HPLC wurde mittels des Varian LC920 Systems mit einer Phenomenex Synergi 4 $\mu$  Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 4  $\mu$ m, 80 Å) Säule mit linearen Wasser-Acetonitril-Gradienten und einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Für die semi-präparative PR-HPLC wurde das Varian LC 940 System ausgestattet mit einer Axia Packed Phenomenex Luna C18 (250 x 21.2 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) Säule mit linearen Wasser-Acetonitril-Gradienten und einer Flussrate von 18 mL/min verwendet. Eluent A (0,1 % TFA) und Eluent B (90 % Äq Acetonitril, 0,1 % TFA) wurden als Lösungsmittel genutzt. Die Trennung der Substanzgemische erfolgte über einen linearen Gradienten von 10 → 60 % B oder 10 → 80 % B über jeweils 20 min.

#### **3.4.9.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)**

Die Gelfiltrationschromatographie ist eine Größenausschlusschromatographie. Hierbei resultiert die Auftrennung lediglich aus dem hydrodynamischen Volumen der Analyten. Die Proteinlösung wird mit einer mobilen flüssigen Phase über eine poröse, stationäre Phase (z.B. Superdex 200 pg 16/60 von GE Healthcare) aufgetrennt. Abhängig von ihrer Größe legen die Moleküle in der Säule unterschiedlich lange Wegstrecken zurück. Kleine Moleküle diffundieren eher in die Poren und benötigen somit eine längere Wegstrecke als größere Moleküle. Deshalb eluieren die Bestandteile einer heterogenen Probe absteigend ihrer Größe. Als mobile Phase wurden sterilfiltrierte und entgaste Puffer verwendet. Die Proben wurden während einem 120 min dauernden Lauf mit einer Flussrate von 1 mL/min über die Säule aufgetrennt.

#### **3.4.9.4 Protein A Affinitätschromatographie**

Die Methode basiert auf der Grundlage, dass Protein A, welches ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt, diverse Spezies von Immunglobulinen bindet. Dabei bindet es an den Fc-Teil der Immunglobuline durch Interaktion mit der schweren Kette, so dass es sich zur Reinigung von Fc-fusionierten Proteinen aus einem Proteingemisch eignet. Als Säule wurde die HiTrap Protein A HP, 1 mL and 5 mL von GE Healthcare verwendet, welche laut Hersteller eine Bindungskapazität von 20 mg humanes IgG/mL Medium aufweist. Die Probe wurde mit einem gleichbleibenden Druck von 0,3 MPa und einer Flussrate von 1 mL/min über die Säule aufgetrennt. Der Probenauftrag auf die Säule erfolgte mittels Superloop (GE Healthcare). Als Laufpuffer wurde

---

20 mM Natriumphosphat, pH7 benutzt. Die Elution der Proteine erfolgte mittels 100 mM Citratpuffer, pH 3 eluiert.

#### **3.4.10 Proteinanalyse durch *Electrospray-Ionisation Mass Spectrometry* (ESI-MS)**

Die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wird zur Analytik von synthetisierten und gefalteten Proteinen verwendet. Die zu analysierende Lösung mit Analyt wird aus einer feinen Kapillare unter Atmosphärendruck versprüht, so dass die Probe in Anwesenheit eines elektrischen Feldes ionisiert und in die Gasphase überführt wird. An dieser Kapillare liegt eine Spannung von 1.000 bis 5.000 V an. Die geladenen Tröpfchen werden zum Massenspektrometer hin beschleunigt, wobei das Lösungsmittel verdampft. Die protonierten Analytmoleküle werden zum Analysator geleitet, wo sie in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Anschließend treffen sie auf den Detektor, der die Flugzeit feststellt, durch die Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der zu analysierenden Probe gezogen werden können. Die Massenspektrometrie ermittelten Molekulargewichte wurden mit den zu erwartenden, berechneten Molekulargewichten verglichen. Das verwendete Gerät war ein mit HPLC gekoppeltes ESI-Massenspektrometer (LC-MS 2020, Shimadzu). Es wurde ein zehnminütiger linearer Gradient (2 → 100 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) bei einer Flussrate von 0,2 mL/min verwendet.

#### **3.4.11 Lagerung von Proteinen**

Die Proteinlösungen wurden entweder bei 4 °C gelagert, gefriergetrocknet oder mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren, so dass die Proteine vor dem Verdau mit Proteinasen geschützt sind und gleichzeitig möglichst lange eine hohe Aktivität zeigen. Um Proteinlösungen zu konzentrieren oder die Ausbeute zu bestimmen, werden Proteine gefriergetrocknet, was unter Vakuum geschieht, welches von der Pumpe der Gefriertrocknungsanlage generiert wird. Unter diesen Bedingungen sublimieren Wasser und andere Lösungsmittel, so dass die Pumpe diese abzieht. Die Proteinlösung wurde in einen Rundkolben oder 50 mL Falconröhrchen gefüllt. Anschließend wurde die Probenoberfläche durch Schwenken der Gefäße in flüssigem Stickstoff vergrößert und somit die Proteinlösung langsam gefroren. Nachdem die Lösung vollständig gefroren war, wurden die Gefäße über Nacht an die Lyophilie (*Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 2-4 LSC*) angeschlossen. Das fertige Lyophilisat konnte danach entnommen und bei Raumtemperatur gelagert werden.

---

Eine andere Methode ist das Einfrieren von Proteinen mittels flüssigen Stickstoffs. Hierbei wurde die Proteinlösung langsam in flüssigen Stickstoff getropft. Dieser wurde danach abgegossen und die einzelnen Proteinkügelchen in ein Falconröhrchen transferiert, welches bei -80 °C gelagert wurde.

#### **3.4.12 Bestimmung von Bindungseigenschaften mittels *Bio-Layer Interferometry* (BLI) Messungen**

Bei der Analyse der Bindungseigenschaften von Proteinen wurde das Octed RED<sup>®</sup> System (FortéBio) mit glasfaserbasierten Biosensoren mit spezifischen Oberflächenmodifikationen verwendet. Diese sind an der Spitze des Sensors mit verschiedenen Beschichtungen wie z.B. Protein A, Streptavidin usw. versehen. Zur Bestimmung der Schichtdicke wird weißes Licht in die optischen Biosensoren eingestrahlt und das entstandene Interferenz-Muster registriert. Das Interferometrie-Profil wird durch die Bindung von Molekülen an die Sensoroberfläche verschoben und je mehr Moleküle binden, desto stärker ist dieser Effekt. Eine Verschiebung des Interferometrie-Profiles in die gegensätzliche Richtung wird beobachtet, wenn Moleküle vom Sensor dissoziieren. Das Gerät liefert somit eine klassische Assoziation-Dissoziation-Kurve, aus der sich Assoziations- ( $k_{on}$ ) und Dissoziationskonstante ( $k_{off}$ ) sowie die Affinitätskonstante ( $K_D$ ) bestimmen lassen.

Um zu zeigen, dass zwei Proteine spezifisch miteinander interagieren, werden die Sensoren mit Protein 1 beladen. Nach den entsprechenden Waschschritten wird der Interaktionspartner Protein 2 in Lösung vorgelegt. Durch Eintauchen der Biosensoren wird dann die Zunahme der Schichtdicke, die Assoziation des Proteins 2 an Protein 1, analysiert. Dann werden die Sensoren in mit Puffer gefüllte Kavitäten transferiert und somit die Dissoziation bestimmt. Mit der Software können dann Bindungskonstanten ermittelt werden.

Ein Experiment wird wie folgt durchgeführt: Zuerst erfolgt eine Inkubation der Biosensoren in Puffer, was eine Schichtdickenschwankungen bei der eigentlichen Messung vermeidet und die zur Proteinstabilisierung aufgetragene Sucrose entfernt. Danach werden die Biosensoren in Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Puffern und Lösungen geführt.

1. Generierung einer konstanten Basislinie in einem Protein freien Puffer
2. Beladung der Sensoren mit der entsprechenden Zielprotein-Lösung (Protein 1)
3. Waschen mit einem Protein freien Puffer

- 
4. Assoziation: Beladung der Sensoren mit der zu analysierenden Bindeprotein-Lösung (Protein 2)
  5. Dissoziation: Waschen der Sensoren mit einem Protein freien Puffer, um die Abnahme der Schichtdicke zu bestimmen

### 3.5 Zellbiologische Arbeitsmethoden

#### 3.5.1 Immunfluoreszenzmarkierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für den Nachweis der auf der Hefeoberfläche präsentierten Proteine erfolgte eine Markierung mit spezifischen Antikörpern. Dafür wurden  $1 \cdot 10^7$  induzierte Zellen (3.1.8) in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß sedimentiert (13.000 U/min, RT, 5 min), der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 20  $\mu$ L Anti-cMyc Antikörper (1:10 Verdünnung) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 500  $\mu$ L PBS wurden die Zellen in 20  $\mu$ L eines mit Biotin-konjugiertem Anti-Maus Antikörpers oder eines mit FITC-konjugiertem Anti-Maus Antikörper (1:20 Verdünnung) resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen konnten die Zellen, die mit dem Anti-Maus-Biotin Antikörper markierten wurden, in 20  $\mu$ L einer S-PE Lösung (1:20 verdünnt) aufgenommen werden und wurden nochmals für 10 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte ein finales Waschen der Zellen mit 200  $\mu$ L PBS und das Resuspendieren des Zellpellets in 200  $\mu$ L PBS. Bis zur FACS-Analyse wurden die Zellen im Dunkeln auf Eis gelagert.

#### 3.5.2 Markierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Zielprotein

Für eine durchflusszytometrische Bindungsanalyse sowie Sortierung nach Trypsin- oder CTLA-4-bindenden Hefezellen *via* FACS wurden induzierte Hefezellen (3.1.8) entweder mit Biotin-markiertem Trypsin oder FITC-markiertem sowie nicht markiertem CTLA-4 gefärbt. Dies erfolgte nachdem die Myc-Präsentation und somit die Präsentation der Miniproteine auf der Hefezellen nachgewiesen wurden (3.8.1). Im Fall einer Einfachmarkierung wurde die gewünschte Menge Hefezellen pelletiert (13.000 U/min, RT, 2 min), in einer Zielproteinlösung (Trypsin oder CTLA-4) der gewünschten Konzentration resuspendiert, für 15 min (analytische Messungen) oder 30 min (Sortierung) auf Eis inkubiert und anschließend mit 500  $\mu$ L PBS gewaschen. Bei der Färbung mit nicht markiertem CTLA-4 wurden die Zellen mit einem Anti-Human-PE Antikörper (1:20 verdünnt), bei der Färbung mit Biotin-markiertem Trypsin mit S-PE (1:20 verdünnt) für 10 min unter Lichtausschluss auf Eis

---

inkubiert. Nach erneutem Waschen konnten die Zellen in 200  $\mu$ L PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss auf Eis gelagert werden.

Für die Durchmusterung der Variantenbibliotheken nach CTLA-4-bindenden Miniproteinen wurden 4 Sortierungsrunden *via* Doppelmarkierung durchgeführt. Dazu wurden in der ersten Sortierungsrunde jeweils  $1 \cdot 10^8$  Hefezellen mit 1 mL CTLA-4-Lösung (1 M, FITC-markiert) gefärbt und anschließend in einem Volumen von 50  $\mu$ L die Myc-Färbung durchgeführt.

### **3.5.3 Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von *Saccharomyces cerevisiae***

Die Analysen per Durchflusszytometrie wurden mit einem *MoFlo*-Zellsortiergerät (*Fluorescence Activated Cell Sorter*, FACS; Fa. Dako Cytomation) durchgeführt. Die Sensitivität und der Strahlengang des FACS wurden mittels fluoreszierender *MicroBeads* (Fa. Beckman Coulter) und *Rainbow Calibration Particles* (8 *peaks*, 3,0-3,4  $\mu$ m, Kisker) eingestellt. Die Photomultiplier wurden auf die Werte 650 (*side scatter*), 600 (FL1: FITC-Fluoreszenz), 600 (FL2: R-Phycoerythrin-Fluoreszenz) und 600 (FL3: Allophycocyanin-Fluoreszenz) eingestellt, und im *Log mode* gemessen. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet. Bei einer Frequenz bei 92.000 Tropfen/s wurde die Anzahl zu analysierender Ereignisse auf maximal 30.000/s beschränkt. Im Fall von durchflusszytometrischen Bindungsstudien wurden 50.000 Ereignisse vermessen und die Auswertung sowie Analyse der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket *Summit* v4.3.

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wurden zusätzlich der Strahlengang sowie der Flüssigkeitsstrahl justiert. Außerdem wurde der Tropfenabrisspunkt sowie der *drop delay* des Geräts kalibriert. Die Sortierungen erfolgten im *sort-enrich1*-Modus. Hefezellen, die im gewählten Selektionsfester vorlagen, wurden in ein 5 mL Röhrchen, das mit 500  $\mu$ L SDCAA-Medium gefüllt war, sortiert und zur Bestimmung der Überlebensrate eine serielle Verdünnungsplattierung angefertigt. Während der Sortierung lag ein Probendruck zwischen 59 und 60 psi vor und die Ereignisfrequenz wurde auf maximal 30.000/s beschränkt.

### **3.5.4 Immunfluoreszenzmarkierung von CHO-K1-Zellen**

Die Analysen der Immunfluoreszenzmarkierung von CHO-K1-Zellen<sup>200</sup> wurden entweder mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager.M2) bei der BioNTech AG oder *via* FACS (BD Influx<sup>TM</sup>) durchgeführt.

---

Für die Immunfluoreszenzanalyse mittels Mikroskop wurden runde Deckgläschen in eine Sechszell-Platte mit DMEM/-F12+Glutamax-Medium (2.9.3) gelegt, darauf  $2,4 \cdot 10^4$  CHO-K1-Zellen/Kavität ausgesät und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 % (w/v) BSA in PBS vorinkubiert, um eine unspezifische Bindung auszuschließen. 5 µg Biotin-konjugiertes Miniprotein (Stocklösung: 1 mg/mL) und 18 µg Streptavidin-Cy3 (Stocklösung: 1 mg/mL) in PBS wurden schüttelnd unter Lichtausschluss für (30 min, RT) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µL des Miniprotein-Streptavidin-Cy3-Mixes für 1 h in einer Dunkel-Feucht-Kammer auf Eis inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TPBS, die Zellen wurden mittels 2 % Formaldehyd für 30 min bei RT fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und abschließend über Nacht mit DAPI (1:5.000 verdünnt) in *fluorescent mounting*-Medium eingebettet. Am nächsten Tag wurden die CHO-K1-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für die Immunfluoreszenzanalyse mittels FACS wurden pro Färbung  $3 \cdot 10^5$  CHO-K1-Zellen eingesetzt. 4 µM Biotin-konjugiertes Miniprotein (Stocklösung: 1 mg/mL) und 1 µM Streptavidin-Allophycocyanin (Stocklösung: 0,2 mg/mL) in PBS wurden schüttelnd unter Lichtausschluss für (30 min, RT) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 µL des Miniprotein-Avidin-Mixes resuspendiert und für 2 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 1 % (w/v) BSA in PBS (1 min, 3.000 U/min) und ein Waschschrte mit PBS (1 min, 3.000 U/min). Danach erfolgte die Analyse der CHO-K1-Zellen im FACS (BD Influx™ cell sorter, BD Software).

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

Die folgenden Kapitel der vorliegenden Arbeit beschreiben die Isolierung und Charakterisierung von neuen potenten und affinen Bindemolekülen des humanen zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA-4). Zunächst wurde eine kombinatorische Miniprotein-Bibliothek basierend auf dem Trypsininhibitor oMCoTI-II aus *Momordica cochinchinensis*<sup>27</sup> erstellt und die funktionelle Präsentation der Miniproteinvarianten auf der Oberfläche von *Saccharomyces cerevisiae* geprüft (Kapitel 4.1). Nach der Bibliotheksvalidierung wurde die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf Bindemoleküle des humanen T-Zell Rezeptors CTLA-4 durchmustert und es erfolgten Bindungs- sowie Sequenzierungsanalysen der isolierten Einzelklone (Kapitel 4.2). Der vielversprechendste Kandidat MC-CT-010 wurde danach chemisch synthetisiert und die Bindungsaffinität sowie Bindungsspezifität überprüft (Kapitel 4.3). Abschließend wurden Experimente zur Untersuchung einer möglichen Oligomerisierung von Miniproteinen durchgeführt. Diese erhaltenen Oligomere und eine mögliche Auswirkung auf die Bindungsaffinität wurden analysiert (Kapitel 4.4).

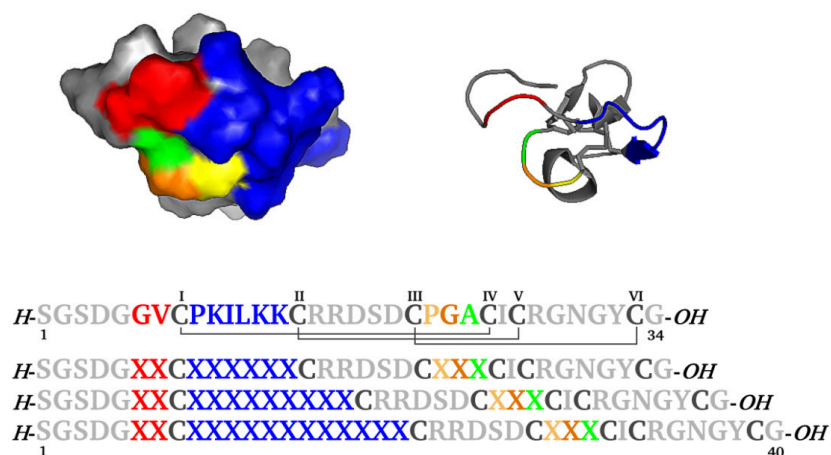
### 4.1 Generierung und Charakterisierung der kombinatorischen Miniprotein-Bibliothek auf Basis von oMCoTI-II

Der verwendete Mikroorganismus, die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, bietet als Vorteile eine einfache Handhabung in ihrer Kultivierung und verfügt über eine eukaryotische Faltungsmaschinerie. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde die Präsentation von Cystinknoten-Miniproteinen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* bereits mehrmals erfolgreich gezeigt<sup>133, 135</sup> und für oMCoTI-II in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls erfolgreich durchgeführt<sup>134</sup>. Das in dieser Arbeit verwendete Miniprotein oMCoTI-II ist eine offenkettige, um fünf Aminosäuren verkürzte Variante des Trypsininhibitors MCoTI-II, welche ebenfalls eine hohe Stabilität und Bindungseigenschaften gegenüber Trypsin aufweist<sup>36</sup>. Daher wurde basierend auf den postulierten Arbeiten die entsprechende oMCoTI(MCopt)-Bibliothek erstellt und die Präsentation der Miniproteinvarianten auf der Hefeoberfläche mittels *yeast surface display*<sup>98</sup> untersucht. Die Validierung erfolgte *via* Durchmusterung auf Trypsin<sup>201</sup>.



#### 4.1.1 Design der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek

Für die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek wurde eine Codon-basierte Randomisierung der Aminosäurereste gewählt<sup>84</sup>. Das von der BioNTech AG entworfene Bibliotheksdesign berücksichtigte bei der Modifikation insgesamt 11 bis 17 ausgewählte von 34 bis 40 Aminosäuren im Miniprotein und erfolgte auf der Grundlage der veröffentlichten NMR-Struktur von MCoTI-II<sup>27</sup>. Dabei war es wichtig, dass die ausgewählten Reste keinen negativen Einfluss auf die Faltung oder Stabilität der Miniproteine hatten. Darin einbegriffen sollte eine möglichst große Interaktionsfläche für die Bindung zum Zielprotein geschaffen werden, was mit dem Austausch der Inhibitorschleife (PKILKK) gegen eine vollständig randomisierte Aminosäuresequenz mit einer Längenvariation von 6, 9 oder 12 Resten zu erreichen war (Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Außerdem wurden benachbarte Aminosäurereste der Inhibitorschleife ausgewählt, um die Kontaktfläche zum Zielprotein und somit die Affinität isolierter Miniproteinvarianten zu erhöhen. In Tabelle 4.1 wird deutlich, dass eine Codon-Verteilung gewählt wurde, bei der hydrophobe Aminosäuren unterrepräsentiert sind, was die Spezifität der isolierten Bindemoleküle maximieren sollte. Studien am verwandten Miniprotein EETI-II<sup>93</sup> lassen den Schluss zu, dass die Aminosäuren außerhalb der Inhibitorschleife relevant für die Faltung sowie Stabilität von oMCoTI-II sein könnten. Deshalb wurde nur eine Teilrandomisierung der dritten Schleife (PGA) durchgeführt und hier die Randomisierung so gewählt, dass die ursprünglichen Aminosäuren zu 50 % beibehalten wurden (Tab. 4.1 und Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Design der oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek. Variierte Bereiche sind im Cartoon (PDB: 1ha9)<sup>27</sup> und der Sequenz des Wildtyp-Moleküls in den verschiedenen Farben illustriert. Die Längenvariationen der Inhibitorschleife sind in Blau dargestellt. Cystein-Reste sind in Dunkelgrau dargestellt sowie nummeriert und Disulfidbrücken in Dunkelgrau illustriert.

Tab. 4.1: Aminosäureverteilung der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek.

Aminosäuren	Randomisierung in %				
	rot	blau	gelb	orange	grün
Alanin (A)	1,43	1,43	0,72	4,17	50
Arginin (R)	7,5	7,5	4,09	4,17	5
Asparagin (N)	7,5	7,5	4,09	-	5
Asparaginsäure (D)	7,5	7,5	4,09	-	5
Glutamin (Q)	7,5	7,5	4,09	-	5
Glutaminsäure (E)	7,5	7,5	4,09	-	5
Glycin (G)	7,5	7,5	4,09	50	5
Histidin (H)	7,5	7,5	4,09	4,17	5
Isolleucin (I)	1,43	1,43	0,72	4,17	-
Leucin (L)	1,43	1,43	0,72	4,17	-
Lysin (K)	7,5	7,5	4,09	4,17	5
Methionin (M)	1,43	1,43	0,72	4,17	-
Phenylalanin (F)	1,43	1,43	0,72	4,17	-
Prolin (P)	7,5	7,5	50	-	-
Serin (S)	7,5	7,5	4,09	-	5
Threonin (T)	7,5	7,5	4,09	4,17	5
Tryptophan (W)	1,43	1,43	0,72	4,17	-
Tyrosin (Y)	7,5	7,5	4,09	4,17	-
Valin (V)	1,43	1,43	0,72	4,17	-

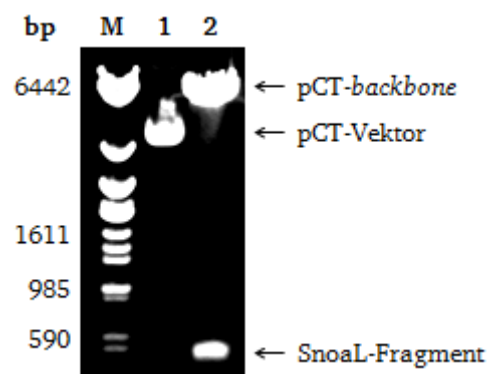
#### 4.1.2 Generierung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek mittels homologer Rekombination

In dieser Arbeit diente die homologe Rekombination in Hefen<sup>123</sup> als Grundlage zur Erstellung von Miniprotein-Variantenbibliotheken. Diese Methode ermöglichte die Integration der Miniproteinvarianten in den pCT-Vektor<sup>117</sup>. Als Voraussetzung wurden homologe DNA-Bereiche auf dem pCT-Vektorfragment sowie dem zu integrierenden DNA-*inserts* benötigt, welche *via* PCR (3.3.3) an das zu integrierende Gen angefügt wurden. Diese homologen Abschnitte werden von den sogenannten Rad-Proteinen, im speziellen von Rad50p, Rad51p sowie Rad52p, erkannt. Rad51p spürt die 3'-Sequenz auf und rekrutiert weitere Proteine, die für die homologe Rekombination zuständig sind<sup>202</sup>. Dadurch kann ein linearisiertes Vektorfragment mit einem zu integrierenden Gen, welche die gleichen homologen Bereiche aufweisen, mit der Hefe *S. cerevisiae* transformiert und anschließend in speziellem Kultivierungsmedium über einen im Plasmid enthaltenen Auxotrophiemarker selektiert werden.

##### 4.1.2.1 Produktion und Reinigung des pCT-Vektors

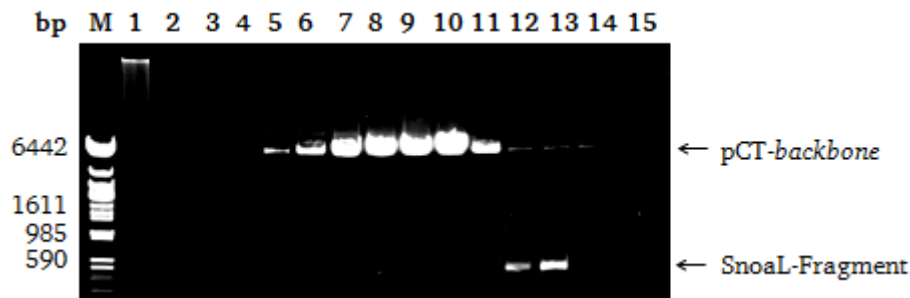
Für die Generierung der Miniprotein-Bibliothek wurde gespaltenes und gereinigtes pCT-Vektorfragment benötigt. Zunächst wurden *E. coli* BL21(DE3) mit dem Vektor pCT-SnoaL

(2.2.2) transformiert (3.1.7) und die Einzelklone auf ampicillinhaltigen dYT-Agar-Platten selektiert (2.9.1). Ein positiver Klon wurde dann in 400 mL ampicillinhaltigem dYT-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert (3.1.1) und am nächsten Tag sedimentiert. Anschließend erfolgte die Isolierung und Reinigung des Vektors mittels *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* (3.2.7.2). Die doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nhe*I verdaut. Unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen wurden 300 µg des Vektors mit 50 Units der Endonukleasen in einem Volumen von 300 µL für 4 h bei 37 °C gespalten (3.3.1). Die Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Abb. 4.2) überprüft und das Vektor-Fragment über einen Sucrose-Gradienten (3.2.9) von dem herausfallenden *Snoa*L-Fragment getrennt.



**Abb. 4.2:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) des gespaltenen pCT-SnoaL Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *Nhe*I und *Bam*HI. **M:** Lambda DNA/*Eco*47I (*Ava*II) Marker. **1:** Der nicht gespaltene Ausgangsvektor pCT-SnoaL. **2:** Der gespaltene pCT-SnoaL Vektor.

Die Zentrifugenröhrchen wurden punktiert und die gesammelten Fraktionen auf Abtrennung des Vektor-Fragments per Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Abb. 4.3) überprüft. Die Fraktionen mit dem isolierten pCT-Vektor-Fragment (Abb. 4.3, Fraktionen 8 bis 10) wurden vereinigt und *via* Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Abschließend wurde das lineare Vektor-Fragment in *Aqua bidest* aufgenommen und dessen Konzentration in Lösung bestimmt (3.2.5).



**Abb. 4.3:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) des über den Sucrose-Gradient gereinigten pCT-Fragments. **M:** Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker. **1-15:** Die gesammelten Fraktionen des Sucrose-Gradienten.

#### 4.1.2.2 Erstellung der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek

Zur Generierung der Miniprotein-Bibliothek durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* EBY100 wurde das Protokoll von Benatuil *et al.* verwendet<sup>122</sup>. Um Bibliotheken mit hoher Diversität und Größe zu generieren, werden zu dem hergestellten Vektor-Fragment (4.1.2.1) auch noch ausreichende Mengen von dem zu integrierenden DNA-Fragment benötigt. Das DNA-Fragment, welches die genetische Information der Miniprotein-Variantenbibliothek kodiert, wurde mittels Gensynthese von der Firma Sloning BioTechnology GmbH synthetisiert. Über PCR (3.3.3) mit den Oligonukleotid-Primern pCT-MCopt-up und pCT-MCopt-lo (2.4)

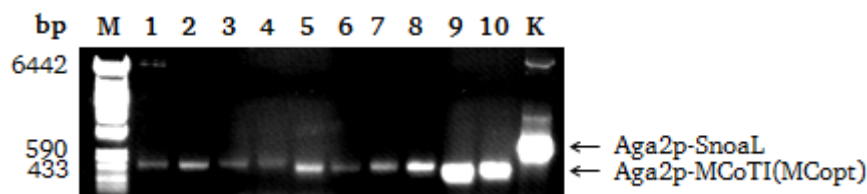
wurde die synthetisch hergestellte Gen-Variantenbibliothek im präparativen Maßstab (96 PCR-Reaktionen) amplifiziert, wobei die 40-bp langen Überhänge für die homologe Rekombination angefügt wurden. Der Erfolg der PCR wurde stichprobenartig mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Abb. 4.4) überprüft. Die PCR-Reaktionen wurden vereinigt und *via* Phenol-Chloroform (3.2.3)



**Abb. 4.4:** Agarosegelelektrophorese (2 % (w/v)) des PCR-Produkts MCoTI(MCopt) mit einer Größe von etwa 215 bp. **M:** *O'GeneRuler™* DNA Ladder. **1:** PCR-Produkt MCoTI(MCopt).

und anschließender Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Für die Erstellung der Miniprotein-Bibliotheken wurden 4  $\mu$ g Vektor-*backbone* und 12  $\mu$ g DNA-*insert* je Transformationsreaktion eingesetzt. Es wurden insgesamt 20 Transformationen, wie im Protokoll von Benatuil *et al.* beschrieben, durchgeführt (3.1.8). Die Anzahl der erzeugten Transformanten wurden durch eine Verdünnungsplattierung auf SDCAA-Agar-Platten (2.9.2) ermittelt und die erfolgreiche Integration der Miniproteinvarianten wurde anhand mehrerer Einzelklone *via* Kolonie-PCR (3.3.4.2) mit den Primern pCT-Seq-neu-up sowie pCT-Seq-

lo (2.4) und anschließend über Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Abb. 4.5) überprüft. Der Ausgangsvektor pCT-SnoaL diente als Kontrolle. Von den zehn getesteten Einzelklonen zeigten alle ein PCR-Produkt mit der Länge von etwa 428 bp (Abb. 4.5) und enthielten somit das Fusionsgen *aga2p-mcoti(mcopt)*, so dass sich daraus eine Klonanzahl mit korrektem *insert* von  $2,7 \cdot 10^8$  ergab. Vor der Validierung dieser Bibliothek wurden Gefrierkulturen angelegt (3.1.5).

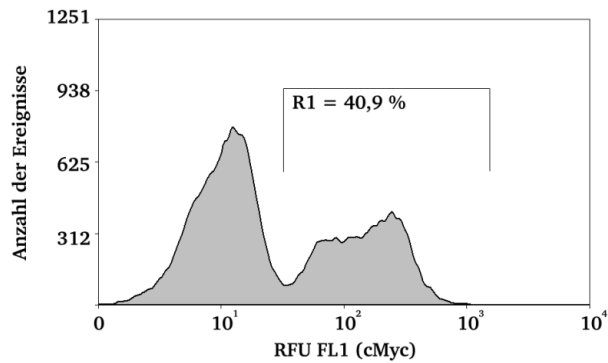


**Abb. 4.5:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR EBY100 pCT-MCoTI(MCopt). Als Oligonukleotid-Primer dienten pCT-Seq-neu-up und pCT-Seq-lo. **M:** Lambda DNA/Eco47I (AvaII) Marker. **1-10:** Die getesteten Einzelklone 1 bis 10. **K:** Der Ausgangsvektor pCT-SnoaL als Kontrolle.

#### 4.1.3 Validierung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek *via* Durchmusterung auf Trypsin

##### 4.1.3.1 Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf Trypsin

Zur Validierung der erstellten Miniprotein-Bibliothek wurde die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf Trypsin aus Rinderpankreas durchmustert. Diese Validierung diente zur Überprüfung der vollständigen Expression und funktionalen Präsentation der Miniproteinvarianten auf der Hefeoberfläche sowie zur Verifizierung der Bibliotheksdiversität und des Durchmusterungsverfahrens. Hierfür wurde die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek in 1 L SDCAA-Medium (2.9.2) über Nacht bei 30 °C kultiviert (3.1.5) und am nächsten Tag die Zelldichte ermittelt (3.1.6). Anschließend wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 1 L SGCAA-Medium (2.9.2) inokuliert, über Nacht bei 20 °C kultiviert und induziert (3.1.9). Die Vollängenexpression des Fusionsproteins Aga2p-MCoTI(MCopt) wurde vor jeder Sortierung über eine cMyc-Epitop-Markierung (Abb. 4.6) mittels Antikörpern nachgewiesen (3.5.1). Wie in Abb. 4.6 dargestellt ist, konnten die Fusionsproteine bestehend aus Aga2p und den MCoTI(Mcopt)-Varianten durch eine spezifische Markierung des C-terminalen cMyc-Epitops auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Im Bereich R1 (Abb. 4.6) sind die markierten Hefezellen zusehen, welche eine starke relative Fluoreszenz aufweisen.

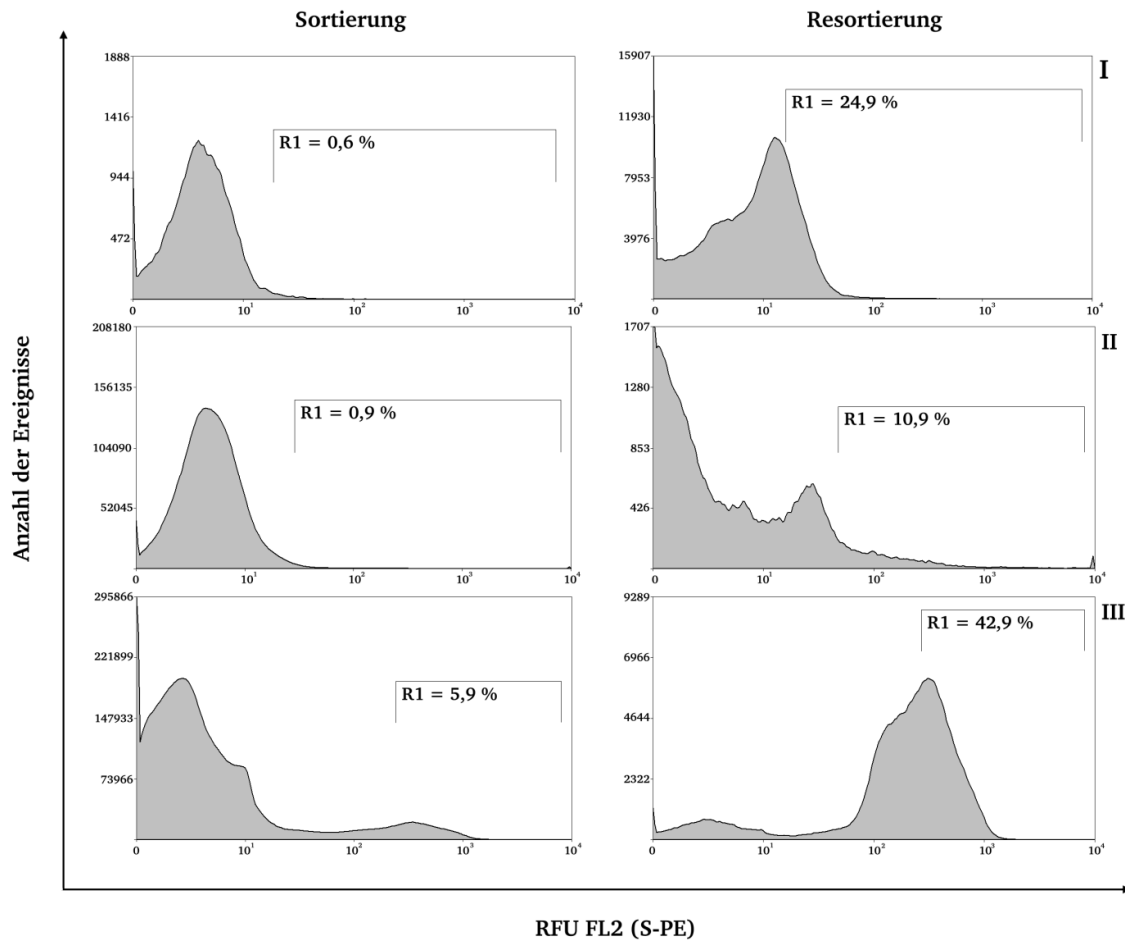


**Abb. 4.6:** Analyse der Oberflächenpräsentation der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek *via* FACS. Das cMyc-Epitop wurde mit spezifischen Antikörpern markiert. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL1, **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse. Insgesamt wurden  $5 \cdot 10^4$  Ereignisse gemessen. **R1:** fluoreszenzmarkierte Hefezellen.

Die Durchmusterung der Bibliothek erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS, 3.5.3). Mit Hilfe einer Einfachmarkierung der Hefezellen mit biotinyliertem Trypsin (3.4.6.1) und Streptavidin-Phycoerythrin (S-PE, 3.5.2) wurden insgesamt drei Sortierungsrunden durchgeführt, wobei jeweils nach der Sortierung eine Resortierung der separierten Hefezellen erfolgte. Die Daten und Ergebnisse dieser Durchmusterung sind in Tab. 4.2 und Abb. 4.7 gezeigt. Über die drei Sortierungsrunden wurde die eingesetzte Trypsin-Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  über 500 nM auf 100 nM reduziert (Tab. 4.2), um die Selektionsstringenz zu erhöhen. In der dritten Sortierungsrunde ist eine Anreicherung Trypsin-bindender Hefezellen zu erkennen, die eine Verschiebung der relativen Fluoreszenz (RFU) nach rechts aufweisen (Abb. 4.7).

**Tab. 4.2:** FACS-Daten der Durchmusterung der oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek auf Trypsin.

	Runde I		Runde II		Runde III	
	Sortierung	Resortierung	Sortierung	Resortierung	Sortierung	Resortierung
<b>Total</b>	$1,6 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^5$
<b>R1</b>	$1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
	0,6 %	24,9 %	0,9 %	10,9 %	5,9 %	42,9 %
<b>Trypsin [nM]</b>	1000		500		100	

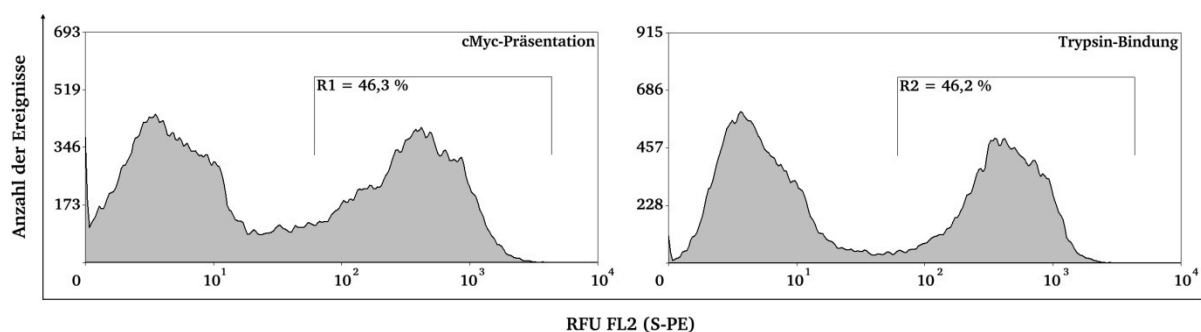


**Abb. 4.7:** FACS-Daten der Durchmusterung der oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek auf Trypsin. Gezeigt ist die drei Selektionsrunde (I, II, III) mit Sortierung und Resortierung (von oben nach unten). Für die Selektion erfolgte eine Einfarbenmarkierung der induzierten Hefebibliothek mit biotinyliertem Trypsin sowie S-PE. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL2, **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse, **R1:** separierte Hefezellen.

#### 4.1.3.2 Charakterisierung der Trypsin-bindenden oMCoTI(MCopt)-Varianten

Nach diesen drei Selektionsrunden wurden einzelne Varianten im Durchflusszytometer vermessen, mittels Kolonie-PCR analysiert und sequenziert. Dazu wurden Verdünnungsplattierungen der dritten FACS-Runde auf SDCAA-Agar-Platten angefertigt. Danach wurden zehn Einzelklone gepickt, jeweils in 2 mL SDCAA-Medium inokuliert und bei 30 °C über Nacht inkubiert (3.1.5). Diese wurden am Folgetag in 7 mL SGCAA-PEG-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt und über Nacht bei 20 °C induziert (3.1.9). Die Oberflächenexpression (3.5.1) und Bindung auf Trypsin (3.5.2) wurden mittels Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen und mittels Durchflusszytometrie (3.5.3) analysiert. Aufgrund der Gleichbehandlung von allen zehn Einzelklonen, sollten die Bindungseigenschaft sowie die Oberflächenpräsentation der Varianten miteinander

korrelieren. Die Markierung der Einzelklone erfolgte jeweils mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen, 100 nM biotinyliertem Trypsin (3.4.6.1) sowie Streptavidin-Phycoerythrin (S-PE). Als Kontrolle wurden die Hefezellen nur mit S-PE gefärbt, um mögliche Streptavidin-bindende Varianten zu identifizieren. Die sich aus diesen Messungen ergebenden Versuchsdaten sind in Abb. 4.8 sowie in Tab. 4.3 dargestellt.



**Abb. 4.8:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse des isolierten Einzelklons EK1. Es wurden die cMyc-Präsentation (**cMyc-Präsentation**) und die Trypsin-Bindung (**Trypsin-Bindung**) der Hefezellen analysiert. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz FL2 (S-PE), **y-Achse:** Anzahl der Ereignisse. **R1, R2:** fluoreszenzmarkierte Hefezellen.

**Tab. 4.3:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse der auf Trypsin isolierten Einzelklone. Die aufgeführte durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean*) der Trypsin-bindenden Hefezellen ergibt sich aus dem in Abb. 4.8 festgelegten R2.

Einzelklon	Trypsin-Bindung ( <i>mean</i> )
EK1	520,4
EK2	479,6
EK3	315,3
EK4	467,9
EK5	387,9
EK6	412,2
EK7	548,4
EK8	582,7
EK9	477,8
EK10	422,6

Als Beispiel ist der Einzelklon EK1 mit seinen FACS-Histogrammen aufgeführt (Abb. 4.8) und in Tab. 4.3 sind die dazugehörigen Daten der Trypsin-Bindung von allen zehn Einzelklonen zusammengefasst. Die zehn Einzelklone zeigten alle eine cMyc-Präsentation sowie eine spezifische Trypsin-Bindung (Tab. 4.3) und keine Bindung gegen S-PE (Daten nicht gezeigt).

Parallel dazu wurden diese zehn Einzelklone *via* Kolonie-PCR analysiert (3.3.4.2) und anschließend über Agarosegelelektrophorese (3.2.4) auf ihre korrekte Größe hin überprüft.





---

BioTechnology GmbH. Die technische Validierung der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek in Phagen, die von der BioNTech AG erfolgreich erstellt wurde, erfolgte über Sequenzanalyse, wobei sich die erhaltene Aminosäureverteilung, wie erwartet, darstellte (Daten nicht gezeigt).

Es wurde gezeigt, dass die oMCoTI(MCopt)-Varianten funktional mittels *yeast display* auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert werden konnten. Hierfür wurde das benötigte pCT-Vektor-Fragment sowie die zu integrierenden Miniproteinvarianten im präparativen Maßstab hergestellt, gereinigt und die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek anschließend über Transformation in *S. cerevisiae* generiert (4.1.2). Die erfolgreiche Oberflächenpräsentation konnte indirekt durch Markierung des C-terminalen cMyc-Epitops gezeigt werden (Abb. 4.6). Zum Nachweis der Funktionalität wurde die Bibliothek nach Trypsin-bindenden Molekülen durchmustert (4.1.3.1). Hier konnten im Verlauf der Selektion über drei Runden mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) Hefezellen isoliert werden, die durch Trypsin markiert wurden (Abb. 4.7). Nach erfolgreichen Oberflächenpräsentations- sowie Bindungsstudien wurden ausgewählte Einzelklone sequenziert. Diese zeigten eine hohe Sequenzhomologie zum oMCoTI-II Wildtyp, wodurch belegt werden konnte, dass aus der erstellten oMCoTI(MCopt)-Bibliothek funktionale und spezifisch-bindende Miniproteinvarianten isoliert wurden. Eine Kontamination mit dem Wildtyp ist jedoch auszuschließen, da sich der Codon-Gebrauch der generierten Bibliothek zum MCoTI-II Wildtyp unterscheidet und zudem die beiden Einzelklone EK4 und EK10 weitere Mutationen zeigten (Abb. 4.9). Die Inhibitionskonstante der einzelnen Varianten wurde nicht genauer untersucht, da in dieser Arbeit nicht die Priorität auf der Charakterisierung Trypsin-bindender Miniproteine lag und die Durchmusterung auf die Serinprotease Trypsin allein der Validierung der Bibliothek sowie des Durchmusterungsverfahrens *via* FACS diente.

---

## 4.2 Isolierung und Charakterisierung neuer Bindemoleküle des humanen zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) auf Basis von oMCoTI-II

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch die Verwendung der gerichteten Evolution Miniproteinvarianten zu isolieren, welche das humane zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen* 4, CTLA-4) binden. Dafür wurde die oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek mittels *yeast display* (4.2.1) durchmustert und parallel dazu erfolgte eine Durchmusterung der Phagenbibliothek, welche von der BioNTech AG geplant sowie generiert wurde, *via* <sup>3</sup>CARD *phage display* (4.2.2).

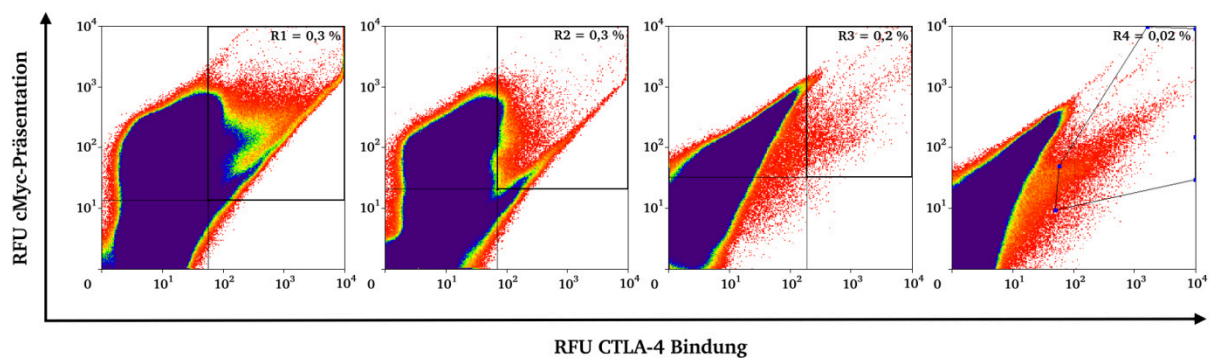
### 4.2.1 Durchmusterung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 *via* Oberflächenpräsentation auf *Saccharomyces cerevisiae*

#### 4.2.1.1 Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 mittels *yeast display*

Für die Durchmusterung auf CTLA-4 wurde die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek in 1 L SDCAA-Medium (2.9.2) über Nacht bei 30 °C kultiviert (3.1.5) und am nächsten Tag die Zelldichte ermittelt (3.1.6). Anschließend wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 1 L SGCAA-Medium (2.9.2) inokuliert und über Nacht bei 20 °C induziert (3.1.9). Die Vollängenexpression des Fusionsproteins Aga2p-MCoTI(MCopt) wurde vor jeder Sortierung mit ca. 10<sup>7</sup> Hefezellen über eine cMyc-Epitop-Markierung mittels Antikörpern nachgewiesen (3.5.1). Die Durchmusterung der Bibliothek erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS, 3.5.3). Es wurde eine Zweifachmarkierung durchgeführt und die Hefezellen anschließend sortiert. Dafür wurden die Zellen in den ersten beiden Runden mit CTLA-4-Ig-FITC (3.4.6.2) sowie den Antikörpern anti-cMyc, anti-Maus-Biotin und S-PE gefärbt. In den beiden letzten Sortierungsrunden wurde die Markierung gewechselt, so dass die Zellen mit CTLA-4-Ig sowie anti-Human-PE und den Antikörpern anti-cMyc sowie anti-Maus-FITC gefärbt wurden. Nach jeder Sortierungsrunde wurde von den separierten Hefezellen ein serieller Verdünnungsausstrich auf SDCAA-Agar-Platten (2.9.2) angefertigt, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Selektion über den Auxotrophiemarker zu gewährleisten. Außerdem wurde von den separierten Hefezellen eine Gefrierkultur zur langfristigen Lagerung der Selektionsrunden angefertigt (3.1.5) und die Hefezellen anschließend erneut kultiviert (3.1.5) sowie induziert (3.1.9). Die Daten und Ergebnisse dieser Durchmusterung sind in Tab. 4.4 und Abb. 4.10 gezeigt.

**Tab. 4.4:** FACS-Daten der Durchmusterung der oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek auf CTLA-4.

	Runde I	Runde II	Runde III	Runde IV
<b>Total</b>	$6,3 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7$
<b>R1 bis R4</b>	$1,8 \cdot 10^6$ 0,3 %	$1,1 \cdot 10^5$ 0,3 %	$2,2 \cdot 10^4$ 0,2 %	$6,2 \cdot 10^3$ 0,02 %
<b>CTLA-4-Ig [<math>\mu</math>M]</b>	1	1	1	1
<b>Markierung</b>	CTLA-4-Ig-FITC $\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-BT, S-PE	CTLA-4-Ig-FITC $\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-BT, S-PE	$\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-FITC CTLA-4-Ig, $\alpha$ -H-PE	$\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-FITC CTLA-4-Ig, $\alpha$ -H-PE

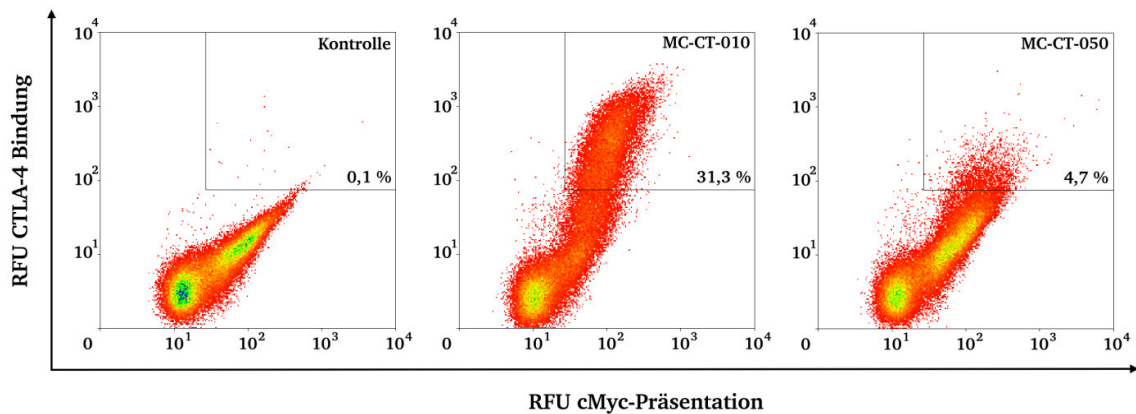


**Abb. 4.10:** FACS-Daten der Durchmusterung der oMCoTI(MCopt)-Variantenbibliothek auf CTLA-4. Gezeigt sind die vier Sortierungsrunden (von links nach rechts). Für die Selektion erfolgte eine Zweifarbenmarkierung der induzierten Hefebibliothek. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der Bindung von CTLA-4-Ig, **y-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der cMyc-Präsentation, **R1-R4:** separierte Hefezellen.

Insgesamt wurden vier Sortierungsrunden durchgeführt. Dabei erfolgte keine Resortierung der separierten Hefezellen und die Zellen wurden mit einer konstanten, eingesetzten Konzentration von  $1 \mu$ M CTLA-4-Ig behandelt (Tab. 4.4). Wie in Tab. 4.4 gezeigt, wurden in der ersten Sortierungsrunde  $6,3 \cdot 10^8$  Zellen durchmustert, was mehr als das Zweifache der Bibliotheksgröße abdeckte. In den drei folgenden Sortierungsrunden wurden ca.  $1$  bis  $3 \cdot 10^7$  Hefezellen durchmustert (Tab. 4.4). In Abb. 4.10 sind die Histogramme der vier Selektionsrunden zu sehen und zeigen die Anreicherung einer Population von Hefezellen, die durch CTLA-4-Ig (nach rechts) und dem cMyc-Antikörper (nach oben) markiert werden konnten, um gleichzeitig die Bindung des Zielproteins sowie die Oberflächenpräsentation der Miniproteine zu gewährleisten.

#### 4.2.1.2 Bindungsstudie und Sequenzierung der CTLA-4-bindenden Miniproteinvarianten

Für die Bindungsanalyse der auf CTLA-4-Ig durchmusterten und isolierten Hefezellen wurden zehn Einzelklone kultiviert (3.1.5) sowie die Präsentation der Miniproteinvarianten induziert (3.1.9). Die Charakterisierung der Einzelklone erfolgte über eine Doppelmarkierung, in welcher die Präsentation des cMyc-Epitops mit den Antikörpern anti-cMyc sowie anti-Maus-FITC (3.5.1) und die Bindung von CTLA-4 mit 1  $\mu$ M CTLA-4-Ig sowie anti-Human-IgG-PE geprüft wurden (3.5.2). Als Kontrolle wurde eine Miniproteinvariante verwendet, welche das cMyc-Epitop präsentierte, aber keine CTLA-4 Bindung zeigte. Die FACS-Histogramme sind in Abb. 4.11 zu sehen.



**Abb. 4.11:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse der isolierten Einzelklone MC-CT010 und MC-CT-050. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen verwendet, die ein Kontroll-Miniprotein (**Kontrolle**) auf der Oberfläche präsentierten. Gezeigt sind zweidimensionale Dotplots, wobei der Farbwechsel von Rot nach Blau eine Zunahme der Zellzahl in dem entsprechenden Bereich signalisiert. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der cMyc-Präsentation, **y-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der Bindung von CTLA-4-Ig.

Von den zehn induzierten Einzelklonen zeigten fünf eine cMyc-Präsentation. In der parallelen Analyse der Einzelklone durch Sequenzierung wurde festgestellt, dass vier der fünf Klone sequenzidentisch waren (MC-CT-010, Abb. 4.12) und somit identische Bindungseigenschaften zeigten (MC-CT-010, Abb. 4.11). Die beiden Einzelklone, MC-CT-010 und MC-CT-050, wiesen sowohl eine relative Fluoreszenz (RFU) bei der Markierung mit CTLA-4-Ig (nach oben) als auch eine deutliche Verschiebung im FITC-Kanal durch die Oberflächenpräsentation des cMyc-Epitops (nach rechts) auf. In Abb. 4.11 wird sichtbar, dass MC-CT-010 eine deutlichere Verschiebung (31,3 %) als MC-CT-050 (4,7 %) zeigt. Die Kontrolle zeigte nur eine deutliche Verschiebung im FITC-Kanal (nach rechts), was die cMyc-Präsentation zeigt. Beide Klone zeigten keine Bindung an Cetuximab<sup>203</sup>, was als Kontrolle verwendet wurde, um eine Bindung an den humanen Fc-Teil von CTLA-4-Ig auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Der BioNTech AG wurde die über Phenol-Chloroform isolierte Plasmid-DNA (3.2.8) der 4. Selektionsrunde zugesandt. Die verschiedenen Miniproteinvarianten wurden in den Expressionsvektor pET-32K (2.2.2) kloniert, in *deepwell* Platten produziert und *via* ELISA (3.3.6) auf die Bindung gegen CTLA-4-Ig analysiert. Insgesamt konnten 24 putative CTLA-4 Binder identifiziert werden, die alle zur Sequenzanalyse weggeschickt wurden. Die Analyse der Sequenzen und das Sequenzalignment erfolgten mit den Programmen ApE sowie BioEdit. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.12 dargestellt.



**Abb. 4.12:** (A) Aminosäuresequenzen der auf CTLA-4 isolierten Einzelklone mittels *yeast display*. (B) Sequenzvergleich der auf CTLA-4 isolierten Klone mit dem MCoTI-II Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp-Aminosäuren an. Aufgrund der verschiedenen Schleifenlängen (6, 9 und 12 Aminosäuren) wurden beim Sequenzvergleich Lücken eingefügt, um die Sequenzen übereinanderlegen zu können. Die Cysteine I bis VI sind in Schwarz unter den Sequenzen durchnummeriert. Die Anzahl, wie oft die verschiedenen Klone vertreten waren, wird durch die Zahlen in den Klammern angegeben. Der Sequenzvergleich wurde per BioEdit erstellt.

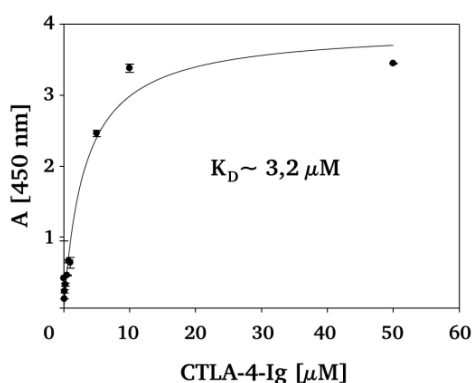
Eine Sequenz war nicht lesbar, eine andere enthielt einen *frameshift*. In Abb. 4.12-B ist zu erkennen, dass alle zehn Miniproteinvarianten keinerlei Sequenzübereinstimmungen in der Inhibitorschleife (PKILKK) zum Wildtyp aufweisen. Auch die flankierenden Regionen (GV und PGA), welche die Inhibitorschleife einrahmen, sind bei diesen Varianten stark mutiert und weichen somit vom Wildtyp ab. Das Miniprotein MC-CT-010 war 13-mal vertreten (ca. 59 % der lesbaren 22 Klone), so dass diese Variante als das dominanteste Bindemolekül in dieser Sequenzierung identifiziert werden konnte (Abb. 4.12-B). Alle anderen Sequenzen traten



---

einmalig auf (Abb. 4.12-B). Wie in Abb. 4.12-A zu erkennen ist, ergab die Analyse drei verschiedene Schleifenlängen (einmal 12, einmal 9 und 20-mal 6 Aminosäuren). In Abb. 4.12.-B ist zu sehen, dass MC-CT-010 sowie MC-CT-050 ein XYXHVP-Motiv in der Schleife zeigen. An Position 10 tritt in 30 % der Sequenzen ein Tyrosin auf (K10Y), so dass hier der Austausch von einer positiv geladenen zu einer neutralen Aminosäure präferiert wird. Außerdem treten in 50 % der Sequenzen die Mutation V7K/R und in 40 % der Sequenzen die Mutation P9K/R auf, so dass an diesen Positionen der Austausch von einer hydrophoben zu einer hydrophilen Aminosäure präferiert wird. In 50 % der Sequenzen tritt ebenfalls die Mutation K14P auf, so dass hier der Austausch von einer basischen zu einer hydrophoben Aminosäure präferiert wird.

Zur ersten Abschätzung der Bindungskonstanten wurde ein Bindungs-ELISA (3.3.6) mit den vier Miniproteinvarianten MC-CT-010, MC-CT-020, MC-CT-030 und MC-CT-040 durchgeführt. Diese Varianten wurden bei der BioNTech AG als Thioredoxin-Fusionen produziert sowie analysiert. Die Miniproteine (4  $\mu\text{g}/\text{Kavität}$ ) wurden hierfür auf einer Maxisorp Mikrotiterplatte (Nunc) immobilisiert, danach erfolgte ein einstündiger *blocking*-Schritt mit 1 % (w/v) Milchpulver (Sigma Aldrich) in TPBS und die Entwicklung mit 0-50  $\mu\text{M}$  CTLA-4-Ig, dem Antikörper anti-Human-HRP (1:5.000, Sigma Aldrich) sowie der TMB-Lösung (Sigma Aldrich). Die Analyse ergab eine konzentrationsabhängige Bindung der Miniproteine an CTLA-4. Die Variante MC-CT-010 zeigte sich in diesem Assay als das affinste Bindemolekül (Abb. 4.13). Die apparenten Bindungskonstanten ( $K_D$ ) waren bei allen vier Varianten im ein- bis zweistelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich (Tab. 4.5).



**Abb. 4.13:** ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Miniproteinvariante MC-CT-010 als Thioredoxin-Fusion. Die konzentrationsabhängige Bindung von CTLA-4-Ig an das Miniprotein wurde in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über den Antikörper anti-Human-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

**Tab. 4.5:** Zusammenfassung der im ELISA ermittelten, apparenten Bindungskonstanten ( $K_D$ ) der Miniproteinvarianten MC-CT-010, MC-CT-020, MC-CT-030 und MC-CT-040 als Thioredoxin-Fusionsproteine.

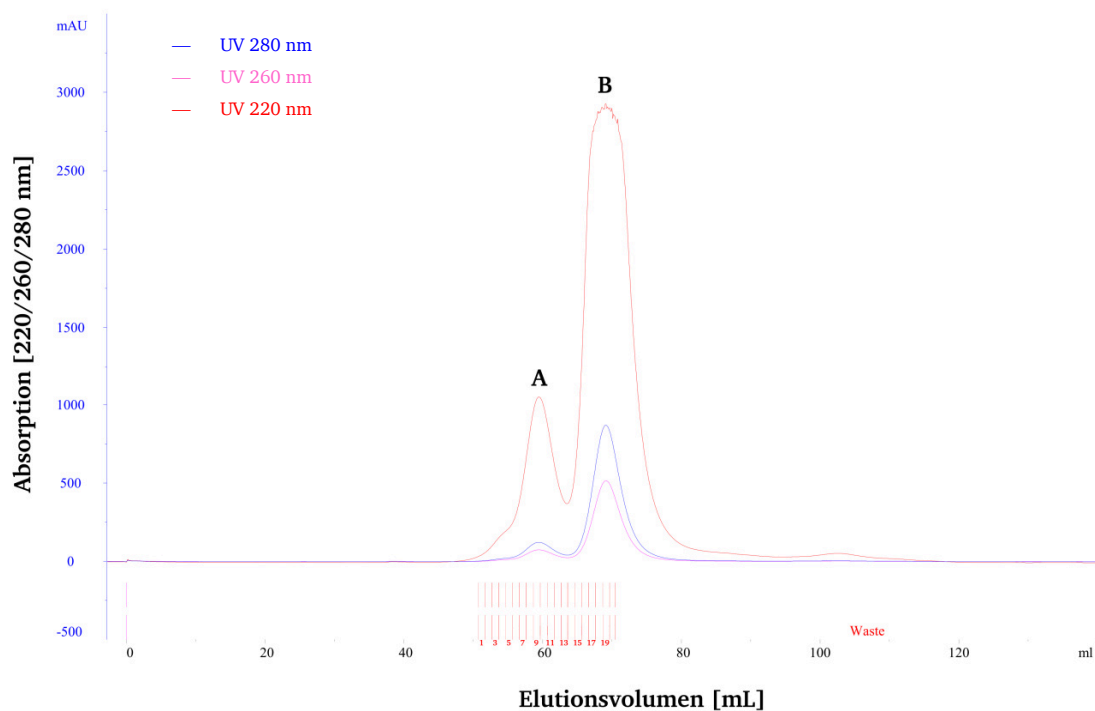
Variante	apparente $K_D$ [ $\mu M$ ]
MC-CT-010	3,2
MC-CT-020	17,1
MC-CT-030	7,1
MC-CT-040	20,7

#### 4.2.2 Durchmusterung der kombinatorischen oMCoTI(MCopt)-Phagenbibliothek auf CTLA-4 *via* $^3\text{CARD}$

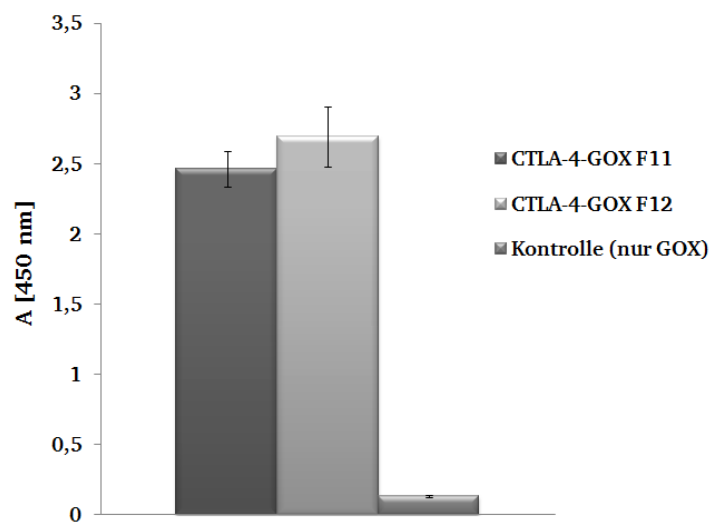
##### 4.2.2.1 Selektion der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf CTLA-4 mittels $^3\text{CARD}$

$^3\text{CARD}$  (*triple catalytic reporter deposition*) ist ein Verfahren zur Selektion von Bindemolekül-präsentierenden Phagen, welche über die Bindung des Zielproteins und enzymatischer Reaktionen dreier Enzyme (Peroxidase, Oxidase und Katalase) kovalent mit Biotintyramid markiert werden<sup>183</sup>. Die markierten Phagen werden durch magnetische Streptavidin-*beads* aus einer Lösung mit nicht-bindenden Phagen selektiert. Im Vergleich zum konventionellen *phage display*<sup>204</sup> können die markierten Phagen effektiver durch harsche Waschschrte mit Glycin pH 2,2 isoliert und von unspezifisch bindenden Phagen getrennt werden. Für die Selektion *via*  $^3\text{CARD phage display}$  wurde ein CTLA-4-GOX-Konjugat hergestellt. Die Oxidation der Glucose-Oxidase (GOX) sowie die anschließende Kopplungsreaktion von oxidiertem GOX und CTLA-4-Ig wurden nach den Methoden 3.3.5.1 und 3.3.5.2 durchgeführt. Die Analyse der Kopplungsreaktion erfolgte mittels Gelfiltrationschromatographie (3.4.9.3), und das CTLA-4-GOX-Konjugat wurde mit Hilfe von ELISA (3.3.6) sowie ABTS-Test (3.3.8) überprüft. Die dazugehörigen Daten sind in Abb. 4.14 und Abb. 4.15 zusammengefasst.





**Abb. 4.14:** Daten zum durchgeführten GFC-Lauf zur Charakterisierung des CTLA-4-GOX-Konjugates. **A:** Peak des CTLA-4-GOX-Konjugates, **B:** Peak der solitären Proteine (CTLA-4-Ig und GOX).



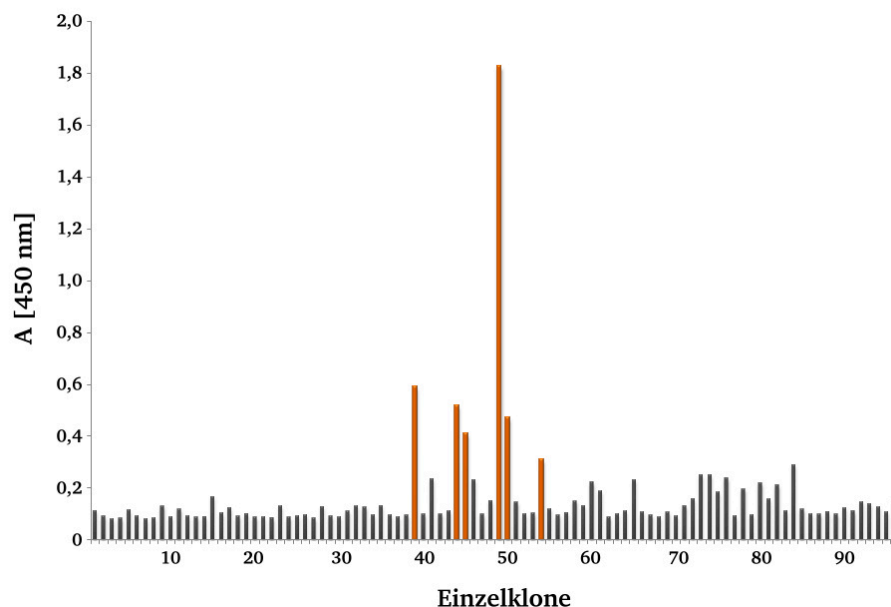
**Abb. 4.15:** ELISA zur Analyse des CTLA-4-GOX-Konjugates in den GFC-Fractionen 11 und 12. Als Kontrolle wurde die Glucose-Oxidase (GOX) verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit anti-Human-IgG-PE, anti-Ziege-Biotin und ExtrAvidin-HRP.

Die Bildung des CTLA-4-GOX-Konjugates (Abb. 4.14, Peak A) konnte durch das veränderte Elutionsprofil im Gegensatz zu den Einzelproteinen (Abb. 4.14, Peak B) bestätigt werden. Der durchgeführte Oxidase-Aktivitätstest mittels ABTS war in allen gesammelten Fraktionen positiv (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der ausgewählten Fraktionen, F11 und F12, über

---

ELISA zeigte eine spezifische Bindung der Antikörper anti-Human-IgG-PE sowie anti-Ziege-Biotin und ExtrAvidin-HRP an CTLA-4-Ig, und bestätigte erneut die Kopplung von CTLA-4 an die Glucose-Oxidase (Abb. 4.15). Die Kontrolle (nur GOX) zeigte keine Bindung (Abb. 4.15).

Die verwendete MCoTI(MCopt)-Phagenbibliothek wurde von der BioNTech AG konstruiert sowie generiert und besitzt eine ungefähre Diversität von  $1 \cdot 10^{10}$  Phagen. Bevor eine Selektionsrunde mittels  $^3\text{CARD}$  *phage display* durchgeführt wurde, wurden  $100 \mu\text{L}$  MCoTI(MCopt)-Phagen ( $1 \cdot 10^{13}$ ) gegen Streptavidin-Dynabeads<sup>®</sup> T1, BSA und Glucose-Oxidase (GOX) vorselektiert, um unspezifische Binder zu eliminieren. Dazu wurde ein Maxisorp-Röhrchen mit 1 % (w/v) BSA sowie 10 mg/mL GOX für 1 h beschichtet und die Phagen zusammen mit  $10 \mu\text{L}$  Streptavidin-beads über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  vorselektiert. Anschließend wurde eine Selektionsrunde *phage display* mit Hilfe des  $^3\text{CARD}$  Systems nach Methode 3.3.5.3 durchgeführt. Der erste Phagentiter nach der Biotintyramid-Kopplung betrug  $7,7 \cdot 10^{11}$  und der zweite Phagentiter nach der Selektion  $4 \cdot 10^6$ . Um mögliche CTLA-4-bindende Miniprotein zu isolieren, wurde von 96 Einzelklonen eine Phagenproduktion in einer *deepwell* Platte durchgeführt (3.1.3) und die Phagen anschließend *via* Phagen-ELISA analysiert (3.3.7). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16 zu sehen.



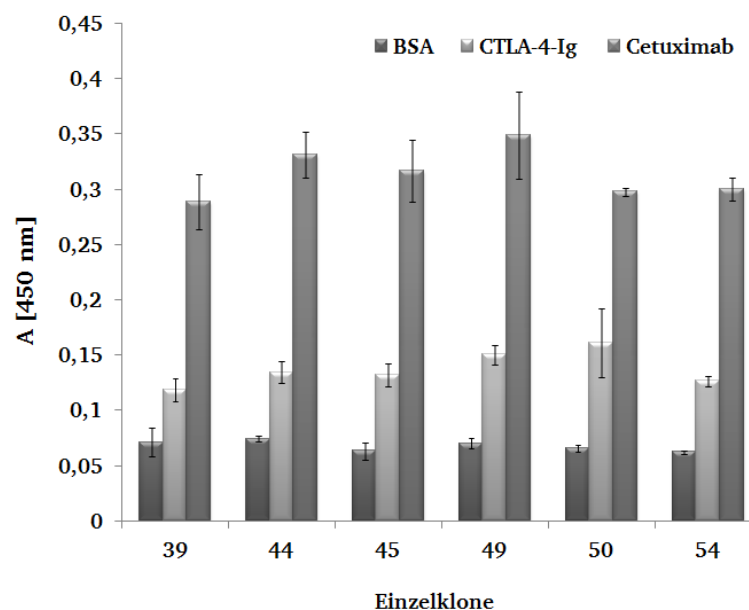
**Abb. 4.16:** Phage-ELISA von 96 Einzelklonen. Die Entwicklung erfolgte mit einem HRP-gekoppeltem anti-pVIII Antikörper. Die in Orange dargestellten Einzelklone wurden in weiteren Experimenten (4.2.2.2) analysiert.

---

Von den 96 getesteten Einzelklonen zeigten sechs Klone (Klon 39, 44, 45, 49, 50 und 54) eine gemessene Absorption bei 450 nm über 0,3 und somit eine mögliche Bindung an CTLA-4-Ig (Abb. 4.16). Es erfolgte eine nähere Untersuchung dieser sechs Einzelklone. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.2.2.2 zusammengefasst.

#### 4.2.2.2 Bindungsstudien und Sequenzierung der isolierten Miniproteinvarianten

Die sechs isolierten Einzelklone wurden *via* Phagen-ELISA (3.3.7) genauer analysiert. Hierzu wurde nicht nur die Bindung der oMCoTI(MCopt)-Phagen gegen CTLA-4-Ig getestet, sondern auch gegen BSA und Cetuximab (Merck KGaA), um die Spezifität der Binder festzustellen. Dafür erfolgte eine 50 mL Phagenproduktion der sechs Einzelklone (3.1.2) und der Phagentiter wurde bestimmt (3.1.4). Anschließend wurde der Phagen-ELISA, wie in 3.6.2.2 beschrieben, durchgeführt. Pro Kavität wurden ca.  $1,5 \cdot 10^9$  Phagen in 1 % (w/v) BSA in PBS eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.17 dargestellt.

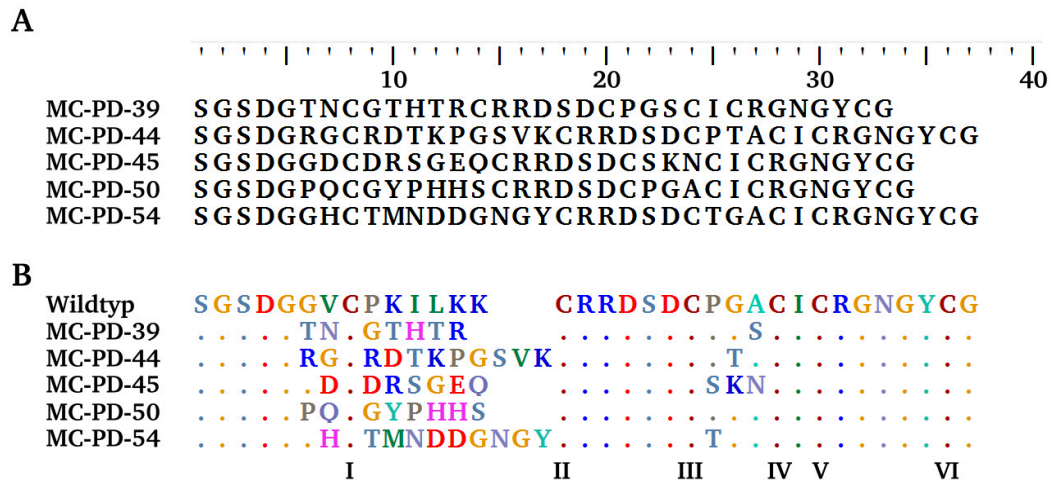


**Abb. 4.17:** Phage-ELISA von den sechs ausgewählten Einzelklonen. Es wurden jeweils Die Entwicklung erfolgte mit einem HRP-gekoppeltem anti-pVIII Antikörper.

Alle sechs Einzelklone zeigten eine schwache Bindung an CTLA-4-Ig, was sich in der gemessenen Absorption bei 450 nm zwischen 0,1 und 0,2 widerspiegelt. Außerdem zeigten die Klone eine unspezifische Bindung an Cetuximab (Abb. 4.17).

Parallel zur Charakterisierung mittels Phagen-ELISA wurden die Klone *via* Sequenzierung analysiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA mittels *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification*

*System-Kit* extrahiert (3.2.7.1) und danach erfolgte die Sequenzierung mit Hilfe des Oligonukleotids F1-up (2.4) durch die Firma Seqlab (Göttingen). Die Analyse der Sequenzen und das Sequenzalignment erfolgten mit den Programmen ApE sowie BioEdit. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.18 gezeigt.



**Abb. 4.18:** (A) Aminosäuresequenzen der auf CTLA-4 isolierten Einzelklone *via* <sup>3</sup>CARD. (B) Sequenzvergleich der auf CTLA-4 isolierten Klone mit dem MCoTI-II Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp-Aminosäuren an. Aufgrund der verschiedenen Schleifenlängen (5, 6 und 9 Aminosäuren) wurden beim Sequenzvergleich Lücken eingefügt, um die Sequenzen übereinanderlegen zu können. Die Cysteine I bis VI sind in Schwarz unter den Sequenzen durchnummeriert. Der Sequenzvergleich wurde per BioEdit erstellt.

Die Sequenz von Klon MC-PD-49 hatte einen *frameshift*, so dass die genetische Information für ein Miniprotein fehlte. In Abb. 4.18-A ist zu sehen, dass die Einzelklone unterschiedliche Schleifenlängen aufweisen (einmal 5, zweimal 6 und zweimal 9 Aminosäuren). In Abb. 4.18-B ist zu erkennen, dass alle fünf Einzelklone keinerlei Sequenzübereinstimmungen in der Inhibitorschleife (PKILKK) zum Wildtyp aufweisen. Auch die flankierenden Regionen (GV und PGA), welche die Inhibitorschleife einrahmen, sind bei den Einzelklonen stark mutiert und weichen somit vom Wildtyp ab.

### 4.2.3 Diskussion der Ergebnisse

In diesem Abschnitt wurde die in Kapitel 4.1 generierte und validierte oMCoTI(MCopt)-Bibliothek auf Bindemoleküle des zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigens 4 (CTLA-4) durchmustert. Die erfolgreiche Selektion einer kombinatorischen Bibliothek gegen das gewünschte Zielprotein ist von drei Faktoren abhängig: (1) das rationale Bibliotheksdesign, was die Auswahl eines veränderbaren Proteingrundgerüsts beinhaltet, (2) die

---

Bibliotheksdiversität sowie -qualität und (3) das gewählte *display*-Verfahren<sup>205</sup>. Durch mehrere Studien konnte gezeigt werden, dass das *yeast display* als Methode im Hinblick auf die Isolierung von Bindemolekülen zielführend ist. Boder und Wittrup zeigten 1997 in ersten Studien, dass durch die Oberflächenpräsentation von Proteinen auf Hefen und die Durchmusterung der erstellten Variantenbibliotheken in *S. cerevisiae* neue Bindemoleküle identifiziert werden konnten<sup>98, 113</sup>. Die vorliegende Miniprotein-Variantenbibliothek wurde vier Selektionsrunden mittels alternierender Zweifarbenmarkierung auf CTLA-4-Ig sortiert (4.2.1.1). Bei der ersten Sortierungsrunde mittels *yeast display* wurden  $6 \cdot 10^8$  Hefezellen durchmustert, was mehr als das Zweifache der Bibliotheksgröße betrug. Dies und auch die Tatsache, dass die Konzentration von CTLA-4-Ig über die Selektionsrunden konstant bei  $1 \mu\text{M}$  blieb, wurde bewusst gewählt, um mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Anreicherung von CTLA-4-bindenden Miniproteinvarianten zu erreichen. Diese Konditionen und auch die Anwendung der Zweifarbenmarkierung führten schlussendlich zu einer Anreicherung und somit zu einer Isolierung von CTLA-4-bindenden Miniproteinvarianten, nachdem bei vorangegangenen Durchmusterungen keine entsprechenden Varianten isoliert werden konnten. Zuvor wurden mehrere Durchmusterungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden sowohl die Markierungsart (Biotin-/FITC-markiertes CTLA-4-Ig oder mit dem Sekundärantikörper anti-H-IgG-PE) als auch zwischen Ein- sowie Zweifarbenmarkierung gewechselt. Auch die Konzentration an CTLA-4-Ig wurde variiert. Erst durch die Steigerung der sortierten Zellzahl sowie Erhöhung der CTLA-4-Konzentration konnten entsprechende Miniproteinvarianten isoliert werden. Diese Tatsache zeigt, dass nur Miniproteine im mikromolaren Affinitätsbereich zu CTLA-4 in der vorliegenden Variantenbibliothek vorhanden sind, was mit dem ELISA zur ersten Abschätzung der Bindungskonstanten bestätigt werden konnte (Tab. 4.5). Ein Grund dafür könnte die nicht optimal gewählte Randomisierung der Bibliothek sein. Es ist anzunehmen, dass die Bindungsfläche zum Zielprotein nicht ausreichend war und somit die sterische Passgenauigkeit sowie die gewünschte Affinität nicht erreicht wurde. Hier wäre es von Vorteil, die Längenvariation der Inhibitorschleife weiter zu vergrößern, um die Kontaktfläche zu maximieren. Da die generierte Bibliothek nicht auf CTLA-4-Bindung optimiert wurde, sondern auch zur Durchmusterung anderer Zielproteine diente, wäre auch denkbar, ein CTLA-4-spezifisches Bindemotiv in die Schleife einzuführen. Dieses Motiv könnte aus den vorhandenen CTLA-4-Bindemolekülen, wie beispielsweise dem monoklonalen Antikörper Ipilimumab<sup>167</sup> oder dem Anticalin RS-010#003<sup>206</sup> entnommen werden. Cystinknoten-Miniproteine sind eine vielversprechende Molekülklasse, die hochaffine und selektive Binder hervorbringen kann<sup>30, 207, 208</sup>. Wie in der Einleitung schon erwähnt,

---

gelang bis dato jedoch nur die Isolierung von einigen Miniproteinvarianten, wie beispielsweise Protease-, Integrin- oder Membranprotein-bindenden Knottins<sup>94, 133, 134</sup>. Proteasen als Zielproteine liegen nahe, da viele natürlich vorkommenden Miniproteine Protease-Inhibitoren sind. Die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Binder wurden bei der Durchmusterung einer Hefebibliothek identifiziert, welche das Bindemotiv (RGD) in der randomisierten Schleife trug<sup>133</sup>. Zu CTLA-4-bindenden Miniproteinen liegen noch keine Daten vor.

Parallel zum *yeast surface display* wurde eine Durchmusterung der Bibliothek zur Isolierung von CTLA-4-bindenden Miniproteinvarianten mittels *phage display* durchgeführt. Vorangegangene Studien zeigen, dass die Präsentation von Miniproteinen auf der Phagenoberfläche sowie die Durchmusterung von Phagen-Variantenbibliotheken möglich sind<sup>4</sup>. Beispielsweise wurden mit Min-23, einer verkürzten Variante des Trypsin-Inhibitors EETI-II, als Grundgerüst über *phage display* erfolgreich neue Bindemoleküle gegen verschiedenste Zielproteine isoliert<sup>94</sup>. Die Planung sowie Generierung der hier verwendeten Phagenbibliothek wurde vom Kooperationspartner BioNTech AG vorgenommen. Nach einem Durchmusterungsversuch mit vier Runden konventionellem *phage display* konnte jedoch keine CTLA-4-bindenden Varianten isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Die BioNTech AG führte ebenfalls mehrere Runden *phage display* durch, doch der Erfolg einer Anreicherung von CTLA-4-bindenden Kandidaten blieb aus. Aus diesem Grund wurde eine weitere *phage display* Durchmusterungsmethode gewählt, bei der durch Enzym-gekoppelte Reaktionen bereits erfolgreich Bindemoleküle selektiert wurden<sup>183</sup>. Hierzu wurde, wie in 4.2.2.1 beschrieben, CTLA-4-Ig an die Glucose-Oxidase chemisch konjugiert und nach Reinigung über Gelfiltrationschromatographie (3.4.9.3) im <sup>3</sup>CARD *phage display* verwendet. Die über das <sup>3</sup>CARD *phage display* System identifizierten Miniproteinvarianten zeigten alle eine ausschließliche Bindung zum Fc-Teil des Zielproteins Abatacept (CTLA-4-Ig, Abb. 4.17), welches aus CTLA-4 und einem humanen optimierten Fc-Teil besteht<sup>209</sup>. Da zuvor im *yeast display* nur mikromolare Binder isoliert werden konnte, spricht dies dafür, dass die gewählte CTLA-4-Konzentration von 4,5 nM zu gering war. Eine Erhöhung der Zielprotein-Konzentration ist jedoch durch die <sup>3</sup>CARD-Vorgabe nicht ohne Weiteres möglich, da dies zu unspezifischen Bindungen führen kann. Somit konnte mit beiden *phage display* Systemen keine Anreicherung von CTLA-4-bindenden Kandidaten erreicht werden. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die im *yeast display* isolierten Varianten auf der Phagenoberfläche eine andere Konformation eingehen und somit die Bindungsaffinität absinken könnte oder sogar ausbleiben würde.

---

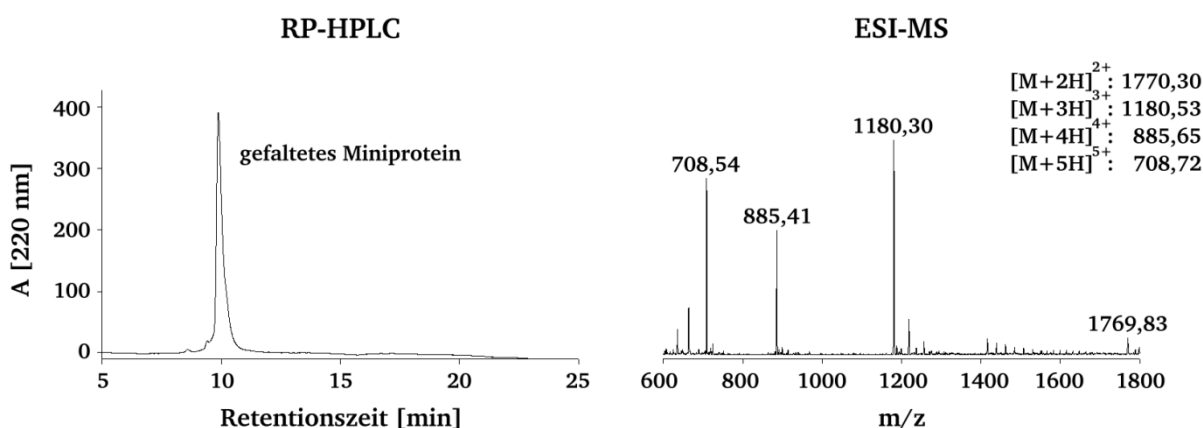
Durch die Bindungsanalysen und Sequenzierung ausgewählter Einzelklone nach der Durchmusterung mittels *yeast display* (4.2.1.2) zeigte sich eine dominante Variante (MC-CT-010), die insgesamt 59 % aller lesbaren Klone der vierten Selektionsrunde ausmachte. Diese und eine weitere Variante (MC-CT-050) zeigten ein XYXHVP-Motiv in der ersten Schleife (Abb. 4.12). Alle anderen isolierten Miniproteinvarianten waren einmalig. Die über *phage display* isolierten Fc-bindenden Miniproteine zeigten dieses Schleifenmotiv in der Sequenzanalyse nicht (Abb. 4.18). Hier lässt sich mutmaßen, dass dieses Motiv spezifisch für die Bindung an CTLA-4 sein könnte. Diese Vermutung könnte sich zukünftig durch eine Sequenzanalyse mittels *next generation sequencing*<sup>210</sup> bestätigen lassen. Außerdem wäre es denkbar, eine weitere Miniprotein-Variantenbibliothek zu generieren, die in der ersten Schleife das gefundene Motiv enthält.

### 4.3 Synthese und Charakterisierung der Miniproteinvariante MC-CT-010

Das folgende Kapitel soll klären, ob die Miniproteinvariante MC-CT-010 ein spezifisches Bindemolekül des T-Zell Rezeptors CTLA-4 ist. Hierfür wurde das Miniprotein chemisch synthetisiert, mit Biotin konjugiert, gefaltet und anschließend gereinigt (4.3.1). Danach folgte die Bestimmung der Bindungseigenschaften mittels ELISA (4.3.2.1) und Immunfluoreszenzmarkierungen von Zellen (4.3.2.2 und 4.3.2.3), welche *via* FACS oder Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden.

#### 4.3.1 Chemische Synthese, Faltung und Reinigung von MC-CT-010

Für die biochemische Charakterisierung wurde die Variante MC-CT-010 mittels Fmoc-basierter Festphasensynthese (SPPS, 3.4.7) hergestellt. Nach anschließender Biotin-Konjugation und oxidativer Faltung (3.4.8) des Knottins wurde das Syntheseprodukt *via* RP-HPLC (3.4.9.2) sowie ESI-MS (3.4.10) auf vollständig verknüpfte Disulfidbrücken analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.15 gezeigt. Die HPLC-Analyse zeigte die vollständige Faltung der Miniproteinvariante MC-CT-010. Das gefaltete Miniprotein zeigte eine Retentionszeit von etwa 10 min (Abb. 4.16). Die errechnete Masse des gefalteten Miniproteins beträgt 3538,66 g/mol. Die Massenanalyse ergab eine Masse von etwa 3537,75 g/mol (Abb. 4.19), was eine Abweichung von 0,03 % entspricht.



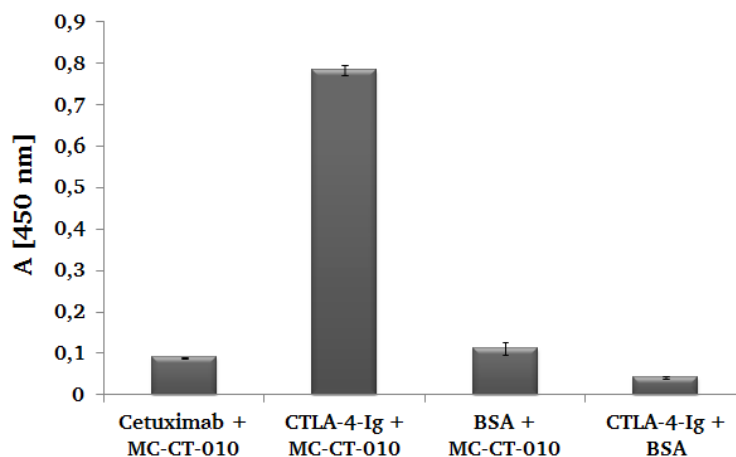
**Abb. 4.19:** RP-HPLC und ESI-MS Daten der gefalteten Miniproteinvariante MC-CT-010. Bei der RP-HPLC Analyse ist das Verhältnis der Absorption bei 220 nm und der Retentionszeit in min gezeigt. Bei der ESI-MS Analyse ist das Masse-zu-Ladung-Verhältnis gezeigt.



### 4.3.2 Biochemische Charakterisierung von MC-CT-010

#### 4.3.2.1 Bestimmung der Bindungsaffinität von MC-CT-010

Die biochemische Charakterisierung und somit die Ermittlung der Bindungseigenschaft der Miniproteinvariante MC-CT-010 erfolgte zuerst mittels ELISA (3.3.6). Hierfür wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit jeweils 12,5  $\mu\text{g}$  CTLA-4-Ig (Abatacept) oder Cetuximab über Nacht beschichtet. Cetuximab wurde als Kontrolle gewählt, um auszuschließen, dass die Variante MC-CT-010 ein Fc-Teil bindendes Miniprotein ist. Nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) BSA in PBS erfolgte die Zugabe von 2,5  $\mu\text{g}$  Biotin-konjugiertem Miniprotein pro Kavität in 1% (w/v) BSA in PBS. Nach einer Inkubationszeit von 40 min und dem fünfmaligen Waschen mit PBS erfolgte eine 40-minütige Inkubationszeit mit ExtrAvidin-HRP (1:5.000). Nach erneutem Waschen wurde der ELISA mit der TMB-Lösung entwickelt, nach 15 min abgestoppt und im ELISA-Reader vermessen. In Abb. 4.20 ist erkennbar, dass die Variante MC-CT-010 spezifisch an CTLA-4 bindet. Die drei Negativkontrollen zeigen eine deutlich niedrigere Absorption, so dass festgestellt werden kann, dass MC-CT-010 kein Fc-Teil bindendes Miniprotein ist.

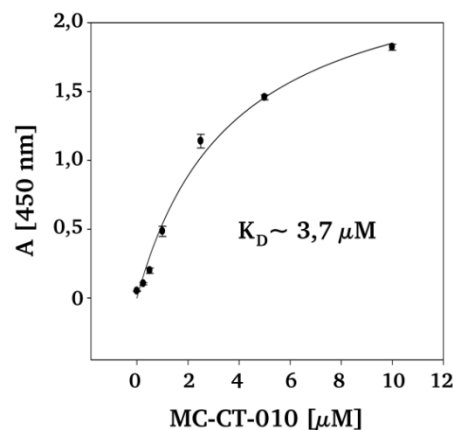


**Abb. 4.20:** ELISA zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der Miniproteinvariante MC-CT-010. Die Bindung des Biotin-konjugiertes MC-CT-010 wurde auf Cetuximab, CTLA-4-Ig und BSA in einer Dreifachbestimmung getestet, aus der sich die Fehlerbalken ergeben. Als weitere Negativkontrolle diente CTLA-4-Ig ohne die Zugabe von Miniprotein. Die immunologische Detektion erfolgte mittels ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung.

Anschließend wurde ein weiterer ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Miniproteinvariante MC-CT-010 durchgeführt. Erneut erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit CTLA-4-Ig und nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) BSA in PBS wurden verschiedene Konzentrationen (0 bis 10  $\mu\text{M}$ ) von Biotin-konjugiertem Miniprotein pro

---

Kavität zugegeben. Die immunologische Detektion erfolgte mittels ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Nach 15 min wurde die Entwicklung mit einer verdünnten HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen. In Abb. 4.21 ist erkennbar, dass die Variante MC-CT-010 konzentrationsabhängig an CTLA-4 bindet. Die Bindungskurve wurde mit Hilfe von SigmaPlot erstellt und die apparente Bindungskonstante ( $K_D$ ) wurde berechnet<sup>98</sup>. Für das Miniprotein ergab sich eine Bindungsaffinität von etwa  $3,7 \mu\text{M}$  (Abb. 4.21).



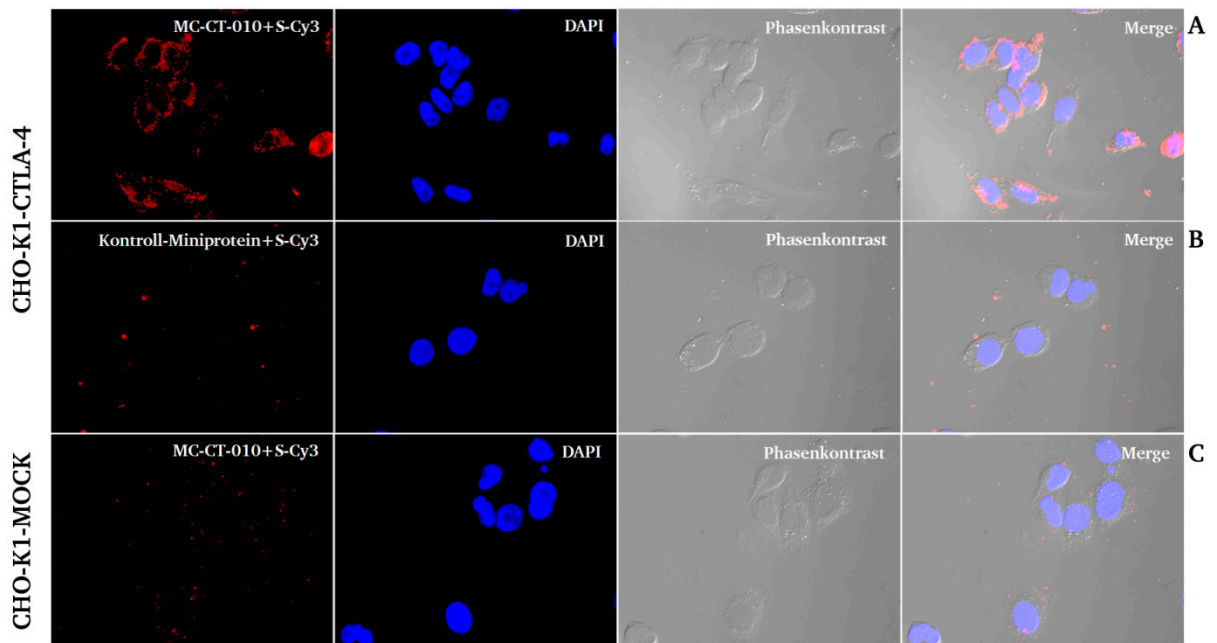
**Abb. 4.21:** ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Miniproteinvariante MC-CT-010. Die konzentrationsabhängige Bindung von MC-CT-010 an CTLA-4 wurde in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

#### 4.3.2.2 Bindungsstudien auf CTLA-4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen

Eine weitere biochemische Charakterisierung zur Ermittlung der Bindungseigenschaft der Miniproteinvariante MC-CT-010 erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung (3.5.4) von CHO-K1-Zellen, welche CTLA-4 auf der Oberfläche überexprimieren (CHO-K1-CTLA-4). Die Generierung dieser Zelllinien (CHO-K1-CTLA-4 und CHO-K1-MOCK) erfolgte durch Dr. Joycelyn Wüstehube-Lausch von der BioNTech AG, so dass die Bindungsstudien in Kooperation mit ihr durchgeführt wurden.

Hierfür erfolgte eine Vorinkubation von  $5 \mu\text{g}$  Biotin-markiertem Miniprotein mit  $18 \mu\text{g}$  Streptavidin-Cy3 (S-Cy3) für 30 min bei RT. Nach dem *blocking* der CHO-K1-Zellen mit 3 % (w/v) BSA in PBS, um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden die Zellen mit dem Miniprotein-Avidin-Mix für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach mehreren Waschschritten, der Fixierung der Zellen mit 2 % Formaldehyd und einer DAPI-Markierung über Nacht

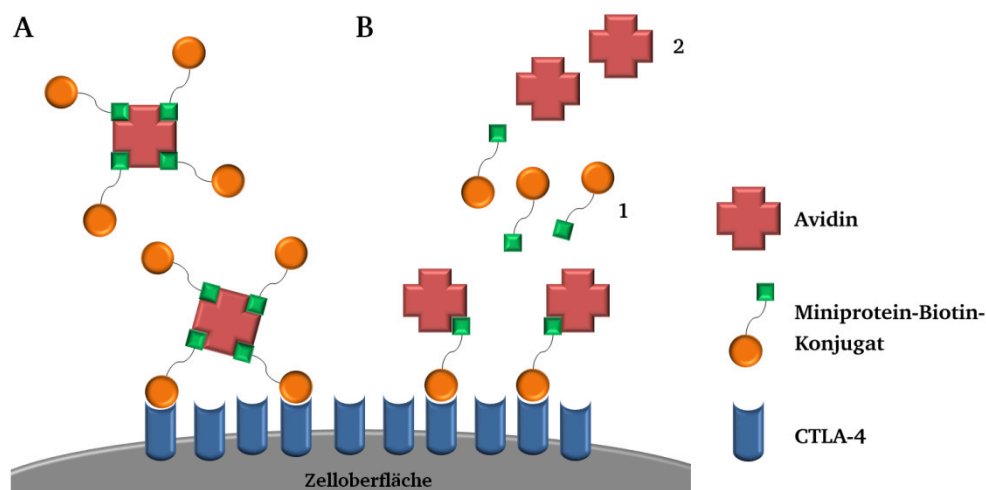
wurden die Zellen mit einem Zeiss Mikroskop (Axio Imager.M2) mit einem 63x-Objektiv bei einer Belichtungszeit von 200 ms von Dr. Joycelyn Wüsthube-Lausch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.22 zusammengefasst.



**Abb. 4.22:** Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der Miniproteinvariante MC-CT-010 an CTLA-4-positiven (CHO-K1-CTLA-4) oder CTLA-4-negativen (CHO-K1-MOCK) Zellen. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Mikroskop (Axio Imager.M2) mit einem 63x-Objektiv bei einer Belichtungszeit von 200 ms erstellt. Zu sehen sind die Zelloberflächenfärbung mit Miniprotein-Streptavidin-Cy3 sowie die Zellkernfärbung mit DAPI und die Zellen im Phasenkontrast. Merge bezeichnet die Überlagerung dieser drei Aufnahmen. (A) Die Bindung von MC-CT-010 wurde auf CTLA-4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen (CHO-K1-CTLA-4) getestet. Dafür wurden 5  $\mu$ g Biotinmarkiertes Miniprotein und 18  $\mu$ g Streptavidin-Cy3 (S-Cy3) verwendet. (B) Ein Kontroll-Miniprotein, welches nicht an CTLA-4 bindet, wurde als Kontrolle auf die Bindung an CTLA-4-überexprimierende Zellen getestet. (C) Um eine unspezifische Bindung von MC-CT-010 auszuschließen, wurde die Bindung von MC-CT-010 auf CHO-K1-MOCK Zellen getestet, welche kein CTLA-4 auf der Oberfläche tragen.

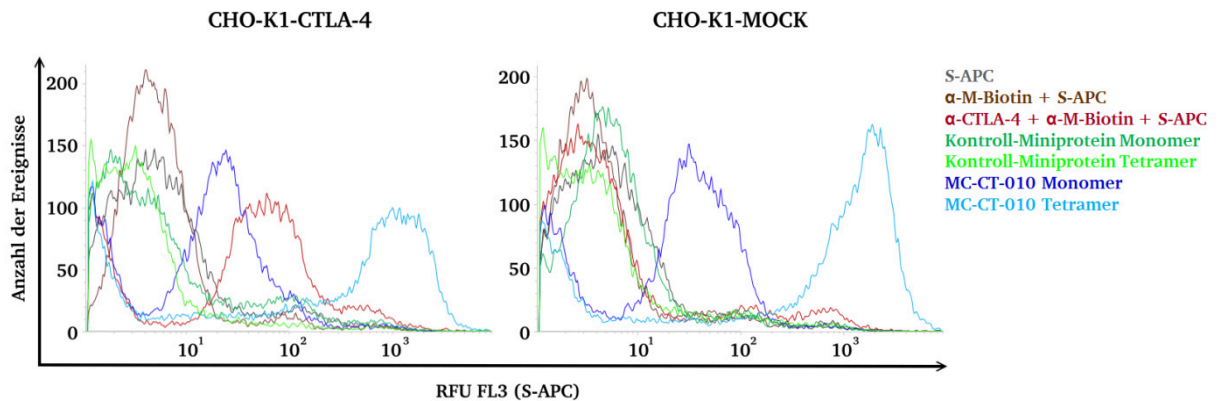
Die Bindung des putativen CTLA-4-Binders (MC-CT-010) an CTLA-4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen im Vergleich zu einer CHO-K1-MOCK (CTLA-4-negativ) Zelllinie konnte mittels Immunfluoreszenz (IF) untersucht werden. Es erfolgte die Feststellung einer spezifischen Bindung von MC-CT-010 an CHO-K1-CTLA-4 (CTLA-4-positiv) Zellen, was die Überlagerung der einzelnen Färbungen mittels Miniprotein-Streptavidin-Cy3 sowie DAPI und die Aufnahme der Zellen im Phasenkontrast zeigt (Abb. 4.22-A, Merge). MC-CT-010 zeigte eine leichte Bindung an CTLA-4-negative (CHO-K1-MOCK) Zellen (Abb. 4.22-C). Das Kontroll-Miniprotein wies ebenfalls leichte Artefakte an CTLA-4-positiven (CHO-K1-CTLA-4) Zellen auf (Abb. 4.22-B).

Zur Verifizierung dieser Immunfluoreszenzanalyse sollten die Markierung wiederholt und mittels FACS analysiert werden. Dafür wurden die CHO-K1-Zellen von M. Sc. Stephan Dickgießer kultiviert, mittels Accutase zur Ablösung der adhären-wachsenden Zellen behandelt und anschließend für die Immunfluoreszenzfärbungen zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach der Accutase-Behandlung zweimal mit PBS gewaschen (1 min, 3.000 U/min, RT). Es erfolgte eine Vorinkubation von 4  $\mu\text{M}$  Biotin-markiertem Miniprotein mit 1  $\mu\text{M}$  Streptavidin-Allophycocyanin (S-APC) für 30 min bei RT. Die Zellen wurden anschließend mit entweder 1  $\mu\text{M}$  Tetramer (Miniprotein-Avidin-Komplex) oder 1  $\mu\text{M}$  Monomer (Biotin-konjugiertes Miniprotein) in PBS für 2 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen, die mit dem Monomer inkubiert wurden, mit 1  $\mu\text{M}$  S-APC in PBS für weitere 30 min auf Eis im Dunkeln markiert. Das dazugehörige Markierungsschema der Zellen *via* Tetra- und Monomer ist in Abb. 4.23 dargestellt.



**Abb. 4.23:** Schematische Darstellung der Zellmarkierung mit Tetra- und Monomer an CTLA-4-präsentierenden Zellen. (A) Markierungsschema *via* Tetramer. Der Miniprotein-Avidin-Komplex wird über Vorinkubation generiert und anschließend mit den Zellen inkubiert. (B) Markierungsschema *via* Monomer. Hierbei werden die Zellen zuerst mit dem Miniprotein-Biotin-Konjugat (1) und anschließend mit Avidin (2) inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit 1 % (w/v) BSA in PBS und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen *via* FACS (BD Influx™ cell sorter, BD Software) analysiert. Die Zellen wurden außerdem zur Kontrolle mit den Antikörpern anti-CTLA-4 (BD Pharmingen™, San Diego, USA) sowie anti-Maus-Biotin und S-APC (jeweils 250 nM) gefärbt, um die Anwesenheit von CTLA-4 auf der Oberfläche der CHO-K1-Zellen festzustellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.24 gezeigt.



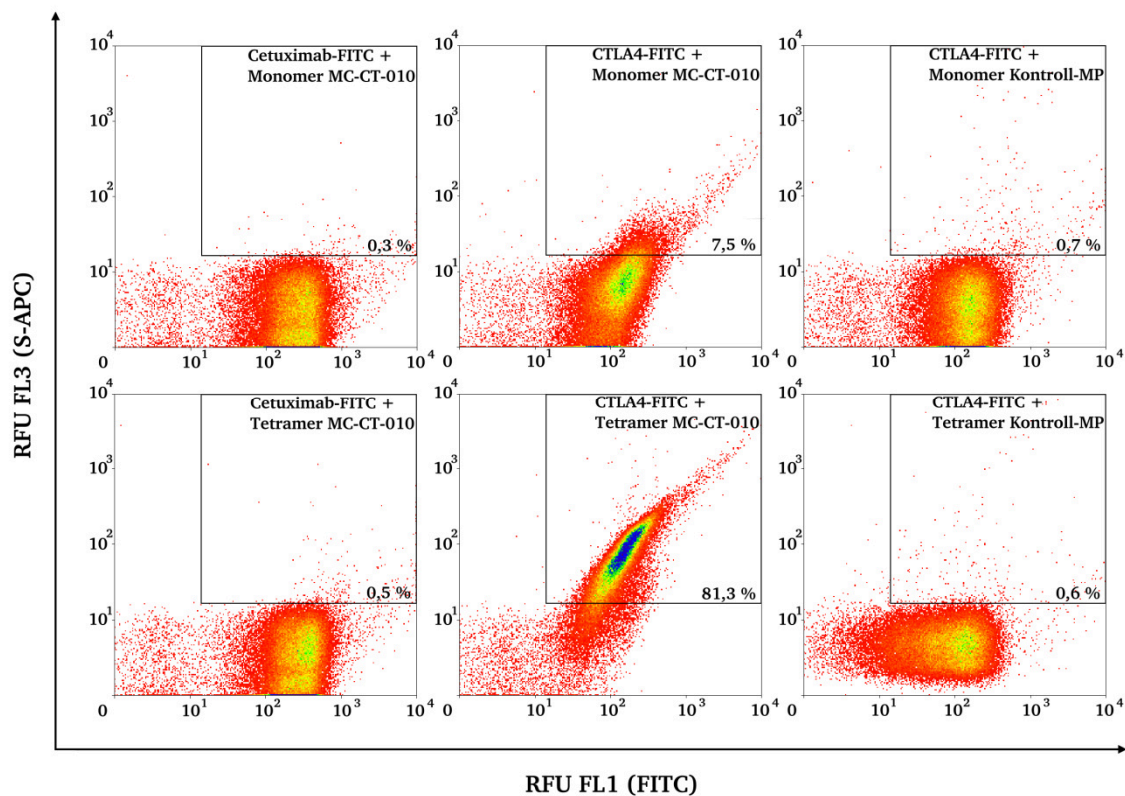
**Abb. 4.24:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse der Miniproteinvariante MC-CT-010 an CTLA-4-positiven (CHO-K1-CTLA-4) oder CTLA-4-negativen (CHO-K1-MOCK) Zellen. Es erfolgte jeweils eine Einfarbenmarkierung der CHO-K1-Zellen. Beide Zelllinien wurden jeweils mit dem Miniprotein-Avidin-Komplex (**Tetramer**), hintereinander mit dem Miniprotein und dann mit S-APC (**Monomer**) sowie zur Ermittlung der CTLA-4-Oberflächenpräsentation der Zellen mit anti-CTLA-4, anti-Maus-Biotin und S-APC gefärbt. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL3, **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse.

Die Analyse mittels FACS zeigte keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf die Bindungseigenschaften des CTLA-4-Binders MC-CT-010. In Abb. 4.24 ist zu erkennen, dass bei der Markierung mit Mono- und Tetramer die CTLA-4-positiven (CHO-K1-CTLA-4) Zellen sowie die CTLA-4-negativen (CHO-K1-MOCK) Zellen eine deutliche Verschiebung der relativen Fluoreszenz (RFU) nach rechts (FL3, S-APC) zeigen. Bei den Färbungen mit dem Kontroll-Miniprotein zeigt sich diese Rechtsverschiebung der Fluoreszenz nicht. Via Antikörperfärbung konnte die Überexpression von CTLA-4 auf den CHO-K1-CTLA-4 (CTLA-4-positiven) Zellen festgestellt werden (Abb. 4.24). Die CTLA-4 negativen Zellen zeigten, wie erwartet, keine deutliche Fluoreszenzverschiebung nach rechts (FL3, Abb. 4.24). Auch der Versuch einen *blocking*-Schritt mit 3 % (w/v) BSA in PBS der Zellen vor der eigentlichen Markierung einzuführen, zeigte keine Änderung (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.2.3 Bindungsstudien auf CTLA-4-präsentierenden Hefezellen

Als weiteres Experiment zur Überprüfung der Bindung von MC-CT-010 an CTLA-4 wurde ein genetisch manipulierter EBY100 Hefestamm (3.1.9) verwendet, welcher hochaffin Fc-Teile von Antikörpern bindet, so dass diese Hefen zur Oberflächenpräsentation von CTLA-4-Ig (Abatacept/Orencia®, Bristol-Myers Squibb) verwendet wurden. Dafür wurden die Zellen in YPD-Medium inokuliert, über Nacht bei 30 °C sowie 200 U/min kultiviert und anschließend erfolgte die Induktion (3.1.9) in YPG-Medium über Nacht (20 °C, 200 U/min). Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  Hefezellen mit 1  $\mu$ M CTLA-4-Ig- FITC

oder Cetuximab-FITC (3.4.6.2) für 30 min auf Eis inkubiert. Parallel dazu erfolgte die Generierung des Tetramers (Miniprotein-Avidin-Komplex) mittels Vorinkubation von 20  $\mu$ M Biotin-konjugiertem Miniprotein (MC-CT-010 oder Kontroll-Miniprotein) mit 5  $\mu$ M Streptavidin-Allophycocyanin (S-APC) über 30 min bei RT sowie 700 U/min. Nach einmaligem Waschen der Hefen mit PBS erfolgte die 20-minütige Inkubation der Zellen auf Eis mit entweder 5  $\mu$ M Tetramer (Miniprotein-Avidin-Komplex) oder 5  $\mu$ M Monomer (Biotin-konjugiertes Miniprotein) in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen, welche mit dem Monomer inkubiert wurden, mit 5  $\mu$ M S-APC in PBS für weitere 10 min auf Eis markiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert. Die FACS-Daten sind in Abb. 4.25 gezeigt.



**Abb. 4.25:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse der Miniproteinvariante MC-CT-010 auf genetisch manipulierten EBY100, welche in der Lage sind über die Bindung des Fc-Teils CTLA-4-Ig oder andere Fc-Fusionsproteine auf der Oberfläche zu präsentieren. Die Bindungsanalysen wurden unter Verwendung der Miniproteine als **Monomer** (drei Abbildungen oben) oder **Tetramer** (drei Abbildungen unten) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden **Cetuximab** und ein Kontroll-Miniprotein (**Kontroll-MP**) verwendet. Gezeigt sind zweidimensionale Dotplots, wobei der Farbwechsel von Rot nach Blau eine Zunahme der Zellzahl in dem entsprechenden Bereich signalisiert. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz FL1 des FITC-markierten CTLA-4 oder Cetuximab, **y-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz FL3 des S-APC-Konjugats, durch welches die Biotin-markierten Miniproteine detektiert wurden.



---

Die Hefezellen, die mit CTLA-4-FITC sowie MC-CT-010 Mono- oder Tetramer markiert wurden, weisen sowohl eine relative Fluoreszenz (RFU) bei der Markierung mit MC-CT-010 Mono-/Tetramer (FL3, nach oben) als auch eine deutliche Verschiebung im FITC-Kanal durch die Oberflächenpräsentation von CTLA-4 (FL1, nach rechts) auf. In Abb. 4.25 wird sichtbar, dass das Tetramer eine deutlichere Verschiebung (81,3 %) als das Monomer (7,5 %) zeigt. Die Negativkontrollen, CTLA-4-FITC mit Kontroll-Miniprotein sowie Cetuximab-FITC mit MC-CT-010, zeigen nur eine deutliche Verschiebung nach rechts (FL1), was die Bindung von CTLA-4 und Cetuximab an die Hefeoberfläche zeigt. Eine Bindung durch das Monomer/Tetramer von MC-CT-010 an Cetuximab oder des Kontroll-Miniproteins an CTLA-4 konnte nicht festgestellt werden (0,3 bis 0,7 %).

#### 4.3.3 Diskussion der Ergebnisse

Das dritte Kapitel beschäftigte sich mit der Bindungsspezifität und -affinität der im Kapitel 4.2 isolierten Miniproteinvariante MC-CT-010, welche im Vergleich zu den anderen identifizierten Kandidaten die höchste Affinität zeigte (Tab. 4.5). Da MCoTI-II durch die geringe Größe synthetisch zugänglich ist, konnte die aus der vierten Selektionsrunde identifizierte Miniproteinvariante (4.2.1.2) erfolgreich über chemische Festphasensynthese und darauffolgender Biotin-Konjugation sowie oxidativer Faltung hergestellt werden (4.3.1). Die abschließende Reinigung und Analyse des Miniproteins erfolgte über RP-HPLC und ESI-MS (Abb. 4.19).

Die Bindungsspezifität und -affinität des Biotin-konjugierten Miniproteins wurden *via* ELISA ermittelt (4.3.2.1). Die Analysen zeigten eine spezifische Bindung der Variante MC-CT-010 an CTLA-4-Ig, so dass eine Bindungsaffinität von etwa 3,7  $\mu\text{M}$  bestimmt werden konnte, was die ermittelte Bindungskonstante als Thioredoxin-Fusionsprotein im vorangegangenen Kapitel bestätigte (Tab. 4.5). Diese Daten zeigten erneut, dass es möglich ist, mit dieser in Kapitel 4.1 generierten oMCoTI(MCopt)-Bibliothek neuartige und spezifische Bindemoleküle gegen CTLA-4 zu identifizieren, welche in ihrer Affinität durch entsprechende Anpassung der Sequenz, wie in 4.2.3 bereits diskutiert, noch gesteigert werden könnten.

Anschließend wurden weitere Bindungsstudien über Immunfluoreszenzmarkierungen von CHO-K1-Zellen durchgeführt, um die erhaltenen Daten zu verifizieren. Die Analyse erfolgte *via* Mikroskop oder FACS. Im Fluoreszenzmikroskop war die Bindung der Miniproteinvariante MC-CT-010 an CTLA-4-positive (CHO-K1-CTLA-4) Zellen nachweisbar (Abb. 4.22-A). Die schwach zu erkennende, aber dennoch auftretende Bindung des CTLA-4-bindenden

---

Miniproteins (MC-CT-010) an CTLA-4-negative (CHO-K1-MOCK) Zellen (Abb. 4.22-C) könnte durch schlechtes Waschen oder durch die Aufnahme in die Zellen über passiven Transport begründet werden<sup>211</sup>. Für diese Hypothese sprechen könnte, dass das Kontroll-Miniprotein, welches nicht an CTLA-4 binden sollte, ebenfalls eine schwache Bindung an die CTLA-4-positiven (CHO-K1-CTLA-4) Zellen zeigte (Abb. 4.22-B) und dass auch bei den Analysen im FACS unspezifische Bindungen des Miniproteins an CTLA-4-negative Zellen (CHO-K1-MOCK) zu erkennen waren (Abb. 4.24).

Da die FACS-Analyse mittels CHO-K1-Zellen durch die unspezifische Färbung der Negativzellen keine eindeutigen Ergebnisse zeigte, wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, die Bindung des Miniproteins auf CTLA-4-präsentierenden Zellen zu charakterisieren. Hierfür wurden genetisch manipulierte EBY100 Hefezellen (3.1.9) verwendet, welche hochaffin den Fc-Teil von Antikörpern binden. In Abb. 4.24 ist zu erkennen, dass diese Hefen zur Oberflächenpräsentation von CTLA-4-Ig geeignet waren. Deshalb konnten die Bindungsanalysen unter Verwendung der Miniproteinvariante MC-CT-010 als Monomer oder als Tetramer *via* Streptavidin durchgeführt werden. Das Miniprotein zeigte sowohl in der monomeren als auch in der tetrameren Variante eine spezifische Bindung an CTLA-4 (Abb. 4.25). Außerdem konnte ein deutlicher Aviditätseffekt durch die Oligomerisierung des Miniproteins mittels Streptavidin-APC festgestellt werden. Die auf Avidin-Biotin-basierende Herstellung von Tetrameren ist eine gängige Methode, welche am häufigsten bei der Markierung von T-Zellen mit pMHC-Multimeren (*peptide-major histocompatibility complex*) verwendet wird<sup>212</sup>. Der dadurch auftretende Aviditätseffekt<sup>213</sup> sowie die Art der Markierung mit Fluorophor-konjugiertem Avidin wurde erstmals von Altman *et al.* im Jahre 1996 genutzt, um bestimmte T-Zell Populationen im FACS zu isolieren<sup>214</sup>. Da die Kontrollen mit humanem Fc (Cetuximab) auf der Hefeoberfläche keinerlei unspezifische Bindung zeigten (Abb. 4.25), bestätigt dies erneut, dass die identifizierte Miniproteinvariante MC-CT-010 ein spezifisches CTLA-4-Bindemolekül ist. Die Daten zur erfolgreichen und verstärkten Markierung durch die Tetramerisierung (Abb. 4.25) lassen den Schluss zu, dass durch die Oligomerisierung des Miniproteins dessen Affinität verbessert wird. Diese Arbeitshypothese soll in Kapitel 4.4 ausführlicher untersucht werden.



---

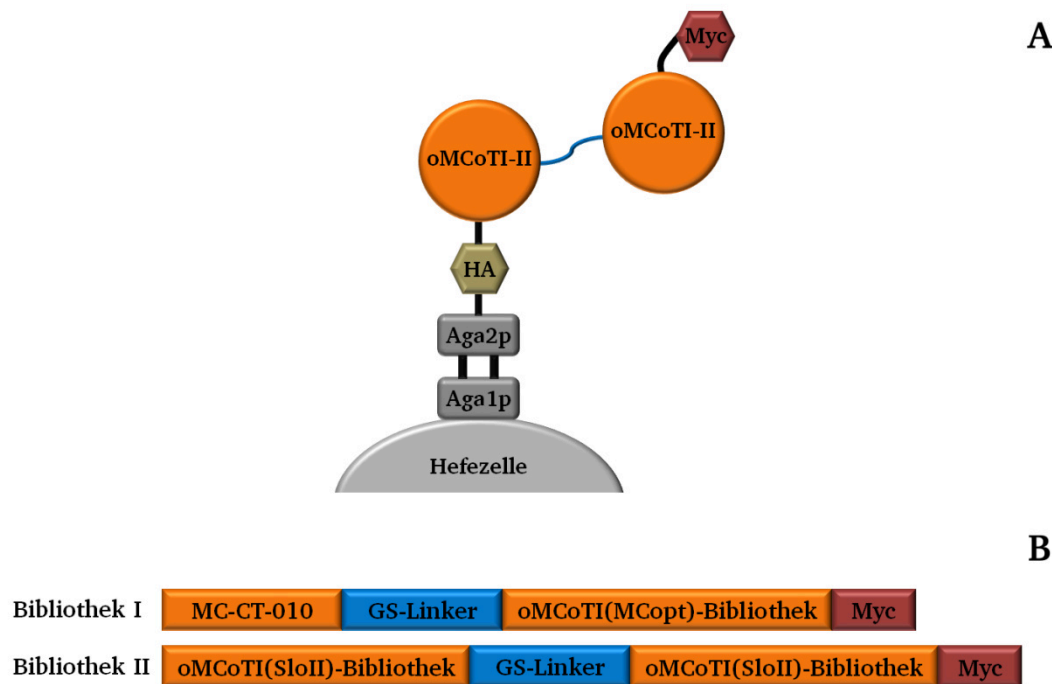
## 4.4 Strategien zur Oligomerisierung von Miniproteinen

Da in Kapitel 4.3.2.3 eine Bindungsverbesserung des Tetramers im Gegensatz zum Monomer festgestellt wurde, sollte der vorherrschende Aviditätseffekt mit verschiedenen Oligomerisierungsstrategien untersucht werden. Dazu wurden zum einen dimerische Miniprotein-Bibliotheken erstellt und auf CTLA-4 durchmustert (4.4.1), um affinere Miniproteinvarianten zu isolieren. Zum anderen wurde das vorhandene CTLA-4-bindende Miniprotein MC-CT-010 auf chemische Weise dimerisiert (4.4.2) sowie mittels Avidin (4.4.3) oder rekombinanter Fusion an einen humanen Fc-Teil oligomerisiert (4.4.4) und anschließend analysiert.

### 4.4.1 Generierung und Durchmusterung von dimerischen Miniprotein-Bibliotheken auf CTLA-4 *via* Oberflächenpräsentation auf *Saccharomyces cerevisiae*

Ziel dieses Kapitels sollte sein, zwei Miniprotein-Bibliotheken, verbunden über einen Glycin-Serin-Linker (GS-Linker), auf der Oberfläche von Hefezellen zu präsentieren und nach affineren CTLA-4-bindenden Kandidaten zu durchmustern. Ähnliche Vorgehensweisen sind in der Literatur beschrieben. So postulierte Silverman, dass Avimere (Abkürzung für *avidity multimer*), welche aus zwei oder mehreren 30 bis 35 Aminosäuren langen Peptiden bestehen und über einen fünf Aminosäuren langen Linker verbunden sind, eine subnanomolare Bindungsaffinität zu ihren Zielproteinen aufweisen<sup>215</sup>. Auch die Affilin<sup>®</sup>-Technologie (Scil Proteins GmbH), basierend auf zwei modifizierten monomeren Ubiquitin-Proteinen verbunden über einen zehn Aminosäuren langen Linker, zeigt eine deutliche Affinitätszunahme zu ihrem Zielprotein im Gegensatz zu den monomeren Formen<sup>216</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei modifizierte monomere Miniproteine als Grundgerüst verwendet, wobei diese über einen zehn Aminosäuren langen GS-Linker "GGGSGGGGS" im *head-to-tail* Format miteinander verbunden waren und als Dimer auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert wurden, was in Abb. 4.26-A schematisch dargestellt ist. Es wurden zwei verschiedene Bibliotheken (Abb. 4.26-B) generiert.



**Abb. 4.26:** Planung der dimerischen Miniprotein-Bibliotheken. (A) Schematische Darstellung der zwei Miniproteine auf der Hefeoberfläche verbunden durch einen Glycin-Serin-Linker. (B) Design der dimerischen Varianten-Bibliotheken (Bibliothek I und Bibliothek II). Der Glycin-Serin-Linker (GS-Linker) ist in Blau, das Myc-Epitop zur Kontrolle der Fusionsprotein-Präsentation in Rot und die verschiedenen Miniproteinvarianten sind in Orange dargestellt.

Bibliothek I beinhaltet die genetische Information für den in Kapitel 4.2.1 isolierten CTLA-4-Binder MC-CT-010, den Glycin-Serin-Linker, die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek (4.1.1) und das C-terminale Myc-Epitop zur Kontrolle der Präsentation des Fusionsproteins (Abb. 4.26-B, Bibliothek I). Bibliothek II beinhaltet die genetische Information für zwei oMCoTI(SloII)-Bibliotheken, die durch den Glycin-Serin-Linker miteinander verbunden waren und ebenfalls ein C-terminales Myc-Epitop trugen (Abb. 4.26-B, Bibliothek II). Die Randomisierung der oMCoTI(SloII)-Bibliothek ist in Abb. 4.27 dargestellt.



**Abb. 4.27:** Design der MCoTI(SloII)-Variantenbibliothek. Variierte Bereiche des Inhibitors sind in der Sequenz des Wildtypmoleküls farbig illustriert. Disulfidbrücken sind als schwarzen Linien und Cystein-Reste in dunkelgrau dargestellt sowie nummeriert.

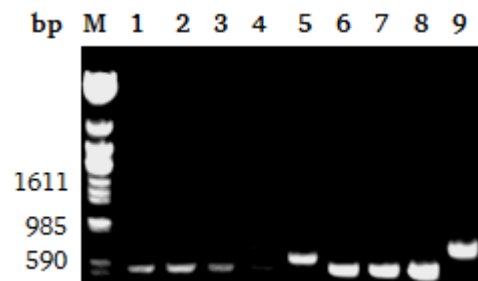
---

Insgesamt wurden 18 der 30 Aminosäurereste des Miniproteins in das Design der Bibliothek einbezogen. Es wurde, wie bei der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek, eine Codon-basierte Randomisierung der Aminosäurereste gewählt<sup>84</sup>. Da hier ebenfalls CTLA-4-Binder und keine Serinprotease-Binder isoliert werden sollten, wurde die Inhibitorschleife (PKILKK) zu 100 % randomisiert (Abb. 4.27). Benachbarte Regionen der Inhibitorschleife wurden in die Randomisierung einbezogen, um mögliche Effekte durch Bindung zusätzlicher Bindungstaschen zu erzielen und somit Affinität sowie Spezifität der isolierten Binder zu erhöhen. Jedoch blieben die ursprünglichen Aminosäuren an den blau-illustrierten Positionen in 50 % aller Fälle erhalten (Abb. 4.27). Da der grün-illustrierte Bereich in Abb. 4.27 eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Faltung und der Stabilität des Trypsin-Inhibitors MCoTI-II spielt<sup>25, 31, 35, 217</sup>, wurden diese Aminosäurereste nur zu 10 % randomisiert. Die oMCoTI(SloII)-Bibliothek wurde für die Bibliothek II gewählt, um die Variabilität von unterschiedlichen Miniproteinen zu gewährleisten und somit die Wahrscheinlichkeit neu isolierter CTLA-4-Binder zu erhöhen.

#### 4.4.1.1 Erstellung und Selektion der dimerischen Bibliothek I

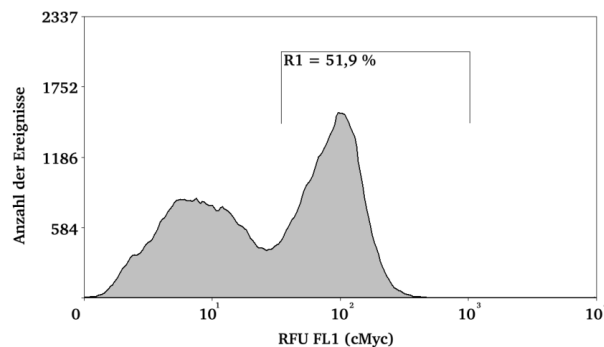
Die dimerische Miniprotein-Bibliothek I (Abb. 4.26-B, Bibliothek I) wurde durch homologe Rekombination mittels der Methode von Benatuil *et al.* in *S. cerevisiae* EBY100 eingebracht<sup>122</sup>. Wie in 4.1.2 beschrieben, wurde das DNA-Fragment, welches die genetische Information der Miniprotein-Variantenbibliothek kodiert, über PCR (3.3.3) im präparativen Maßstab (96 PCR-Reaktionen) amplifiziert. Dabei wurde der Glycin-Serin-Linker und die 40-bp langen Überhänge für die homologe Rekombination mit den Oligonukleotid-Primern Dimeric-CTLA-4-GS-up-außen, Dimeric-GS-MCopt-up-innen, Dimeric-MCopt-Myc-lo-innen und Dimeric-Myc-XhoI-lo-außen (2.4) angefügt. Der Erfolg der PCR wurde stichprobenartig mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4) überprüft (Daten nicht gezeigt). Die PCR-Reaktionen wurden vereinigt und per Phenol-Chloroform (3.2.3) sowie anschließender Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Außerdem wurden für die Generierung der Miniprotein-Bibliothek große Mengen von gespaltenem und gereinigtem Vektorfragment benötigt. Dafür wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Vektor pCT-MC-CT-010, welcher die genetische Information des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010 trug (4.2.1.2 und 4.3), transformiert (3.1.7) und die Einzelklone auf ampicillinhaltigen dYT-Agar-Platten selektiert (2.9.1). Ein positiver Klon wurde dann in 400 mL ampicillinhaltigem dYT-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert (3.1.1), am nächsten Tag sedimentiert und danach erfolgte die Isolierung sowie Reinigung des Vektors mittels *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* (3.2.7.2). Die

doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I verdaut. Es wurden 300 µg des Vektors mit 50 Units der Endonukleasen in einem Volumen von 300 µL für 4 h bei 37 °C unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen gespalten (3.3.1). Die Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4) erfolgreich analysiert und das Vektor-Fragment über Phenol-Chloroform (3.2.3) sowie Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Darauf folgten insgesamt 10 Transformationen (3.1.8) unter Verwendung des Protokolls von Benatuil *et al.* und die Anzahl der erzeugten Transformanten wurden durch eine Verdünnungsplattierung auf SDCAA-Agar-Platten (2.9.2) ermittelt. Die erfolgreiche Integration der Miniproteinvarianten wurde anhand einer Kolonie-PCR (3.3.4.2) mit den Primern pCT-Seq-neu-up sowie pCT-Seq-lo (2.4) und anschließend über Agarosegelelektrophorese (3.2.4) überprüft (Abb. 4.28). Von den neun getesteten Einzelklonen zeigten zwei ein PCR-Produkt mit der Länge von etwa 554 bp (Abb. 4.28). Die restlichen 7 Einzelklone zeigten das *insert* des Ausgangsplasmids pCT-MC-CT-010 (Abb. 4.28). Die Bibliothek I enthielt somit etwa  $2 \cdot 10^8$  Klone und davon trugen  $4,4 \cdot 10^7$  Klone (22 %) das korrekte *insert*. Vor der Durchmusterung nach CTLA-4-bindenden Varianten wurden von dieser Bibliothek Gefrierkulturen angelegt (3.1.5).



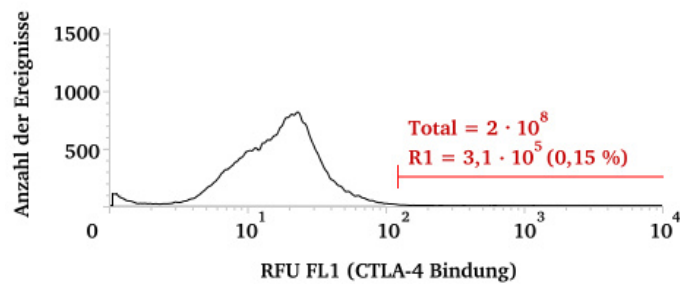
**Abb. 4.28:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR EBY100 pCT-dimeric-CTLA-4-MCoTI(MCopt). Als Oligonukleotid-Primer dienten pCT-Seq-neu-up und pCT-Seq-lo. **M:** Lambda DNA/*Eco*47I (*Ava*II) Marker. **1-9:** Die getesteten Einzelklone 1 bis 9.

Die dimerische Bibliothek I wurde anschließend in 1 L SDCAA-Medium (2.9.2) über Nacht bei 30 °C kultiviert (3.1.5) und am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 1 L SGCAA-Medium (2.9.2) inokuliert, über Nacht bei 20 °C kultiviert sowie induziert (3.1.9). Die Vollängenexpression der Miniproteine wurde vor jeder Sortierung über eine cMyc-Epitop-Markierung (Abb. 4.29) mittels Antikörpern nachgewiesen (3.5.1). Über eine spezifische Markierung des C-terminalen cMyc-Epitops auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* konnten die Miniproteinvarianten nachgewiesen werden. In Abb. 4.29 im Bereich R1 sind die markierten Hefezellen zu sehen, welche eine starke relative Fluoreszenz aufweisen.



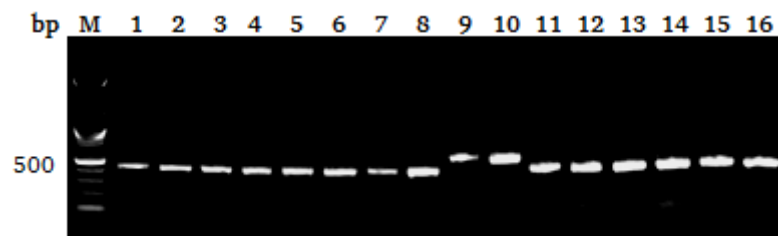
**Abb. 4.29:** Analyse der Oberflächenpräsentation der dimerischen Bibliothek I *via* FACS. Das cMyc-Epitop wurde mit spezifischen Antikörpern markiert. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL1 (FITC), **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse. **R1:** fluoreszenzmarkierte Hefezellen.

Es wurde eine *off-rate selection* durchgeführt<sup>218</sup>, um hoch affine Varianten zu isolieren. Dazu wurde eine Einfarbenmarkierung durchgeführt, wofür 100 mL (ca.  $5 \cdot 10^8$ ) Hefezellen sedimentiert wurden. Diese wurden in 2 mL 150 nM CTLA-4-Ig-FITC (3.4.6.2) resuspendiert und für 45 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 50 mL SGCAA-Medium (2.9.2) in einem Falconröhrchen resuspendiert und bei 7 °C im Dunkeln am Überkopfroterier inkubiert. Nach 4 h wurden die markierten Hefezellen sedimentiert, erneut in 50 mL frischem SGCAA-Medium resuspendiert und über Nacht am Rotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend sortiert. Nach dieser Sortierungsrunde wurde von den separierten Hefezellen ein serieller Verdünnungsausstrich auf SDCAA-Agar-Platten (2.9.2) angefertigt, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Selektion über den Auxotrophiemarker zu gewährleisten. Zusätzlich wurde von den separierten Hefezellen eine Gefrierkultur zur langfristigen Lagerung angefertigt (3.1.5). Die Daten und Ergebnisse dieser Selektionsrunde sind in Abb. 4.30 gezeigt. Es wurde eine Sortierungsrunde *via* FACS (BD Influx<sup>TM</sup>) durchgeführt, wobei keine Resortierung der separierten Hefezellen erfolgte.



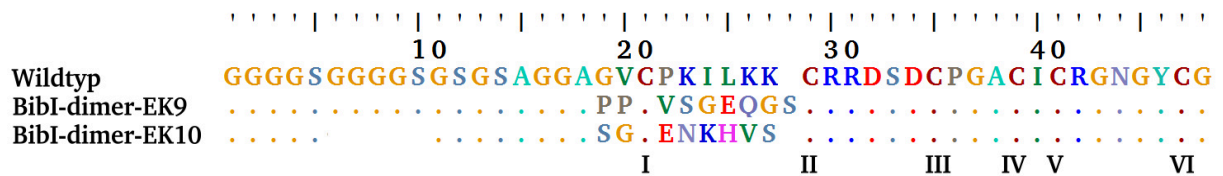
**Abb. 4.30:** FACS-Daten der Durchmusterung der dimerischen Bibliothek I auf CTLA-4. Für die *Off-Rate Selection* erfolgte eine Einfarbenmarkierung über Nacht mit 250 nM CTLA-4-Ig-FITC der induzierten Hefebibliothek. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der Bindung von CTLA-4-Ig, **y-Achse:** Anzahl der Ereignisse, **R1:** separierte Hefezellen.

Anschließend wurde eine Kolonie-PCR (3.3.4.2) durchgeführt, um die Anreicherung von dimerischen Miniproteinen zu überprüfen. Hierzu wurden die Primer pCT-Seq-neu-up sowie pCT-Seq-lo (2.4) verwendet und die PCR wurde anschließend über Agarosegelelektrophorese (3.2.4) überprüft (Abb. 4.31). Von den 16 getesteten Einzelklonen zeigten zwei Klone (12,5 %) das korrekte *insert* mit einer Länge von etwa 554 bp (Abb. 4.31). Die restlichen 14 Einzelklone zeigten das *insert* des Ausgangsplasmids pCT-MC-CT-010 (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR EBY100 pCT-dimeric-CTLA-4-MCoTI(MCopt). Als Oligonukleotid-Primer dienten pCT-Seq-neu-up und pCT-Seq-lo. **M:** 2-Log DNA Ladder. **1-16:** Die getesteten Einzelklone 1 bis 16.

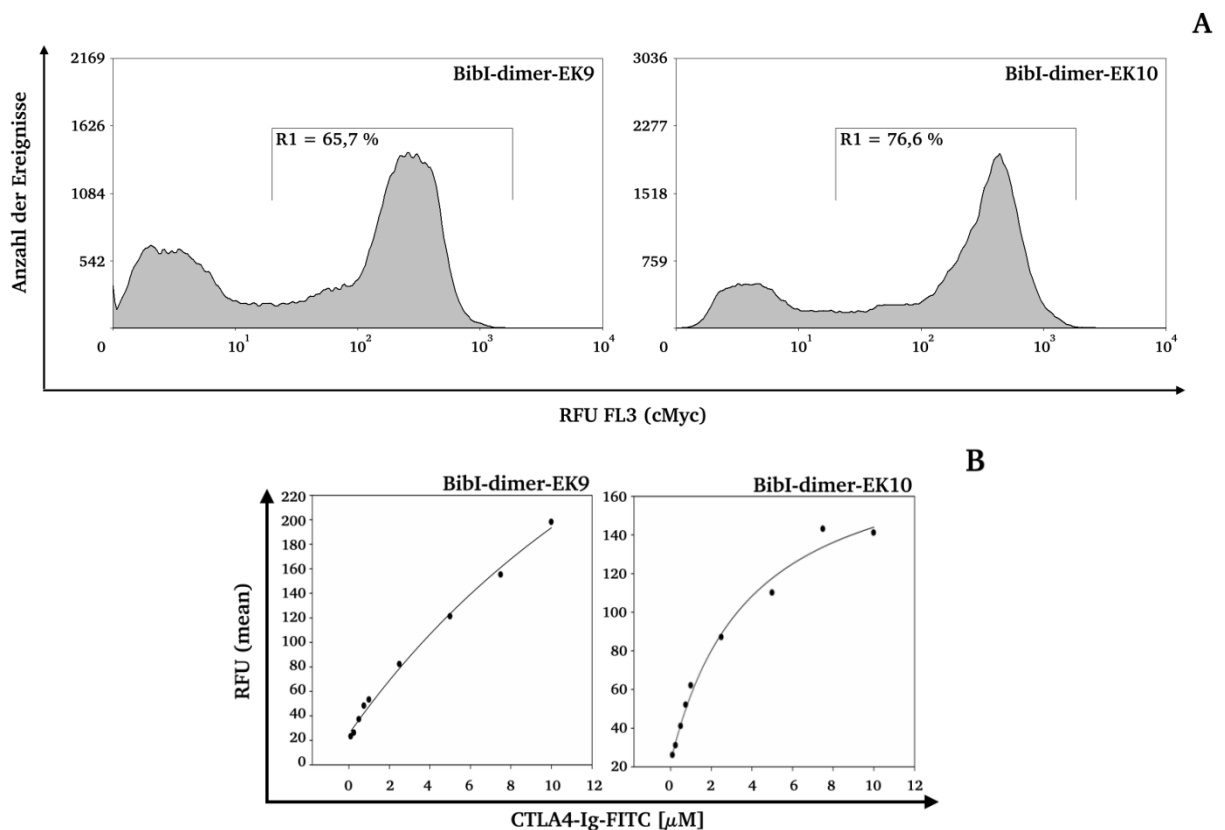
Anschließend erfolgte eine Sequenzanalyse der beiden Einzelklone BibI-dimer-EK9 und BibI-dimer-EK10 mit dem Primer pCT-Seq-lo (2.4) durch die Firma SeqLab (Göttingen). Die Analyse der Sequenzen und das Sequenzalignment erfolgten mit den Programmen ApE sowie BioEdit. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.32 zu sehen. Es ist die Analyse des Glycin-Serin-Linkers und des C-terminalen Miniproteins gezeigt.



**Abb. 4.32:** Sequenzvergleich der auf CTLA-4 isolierten, dimerischen Klone mit dem dimeren Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp-Aminosäuren an. Aufgrund des fehlerhaften, verkürzten Glycin-Serin-Linkers in Klon BibI-dimer-EK10 und der verschiedenen Schleifenlängen im C-terminalen Miniprotein (6 und 7 Aminosäuren) wurden beim Sequenzvergleich Lücken eingefügt, um die Sequenzen übereinanderlegen zu können. Die Cysteine I bis VI sind in Schwarz unter den Sequenzen durchnummeriert. Der Sequenzvergleich wurde per BioEdit erstellt.

Die genetische Information für das N-terminale Miniprotein, die CTLA-4-bindende Variante MC-CT-010 (4.2.1), war bei beiden Sequenzen korrekt und vollständig vorhanden (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4.32 ist zu erkennen, dass nur bei dem Klon BibI-dimer-EK9 der Glycin-Serin-Linker vollständig und korrekt ist. Dem Klon BibI-dimer-EK10 fehlen fünf Aminosäuren (GGGGS), was durch einen Fehler bei der homologen Rekombination in der Hefe zustande gekommen sein kann. Beide Einzelklone weisen keinerlei Sequenzübereinstimmungen in der Inhibitorschleife (PKILKK) und in der flankierenden Region (GV) zum Wildtyp auf (Abb. 4.32). In Abb. 4.32 sind die unterschiedlichen Schleifenlängen der Einzelklone zu erkennen (einmal 6 und einmal 7 Aminosäuren). Klon BibI-dimer-EK10 zeigt in der Sequenz der Inhibitorschleife das Motiv "XYXHVX", wie die identifizierten Klone MC-CT-010 und MC-CT-050 aus Kapitel 4.2.1.2.

Parallel zur Sequenzierung wurden die auf CTLA-4-Ig isolierten Einzelklone BibI-dimer-EK9 sowie BibI-dimer-EK10 für die Bindungsanalyse kultiviert (3.1.5) und induziert (3.1.9). Die Einzelklon-Charakterisierung erfolgte über eine Einfachmarkierung, in welcher die Präsentation des cMyc-Epitops mit den Antikörpern anti-cMyc sowie anti-Maus-FITC (3.5.1) geprüft wurde. Um eine ungefähre Bindungsaffinität abzuschätzen, wurde eine Hefetitrationsdurchführung<sup>98</sup>. Dazu wurden die Hefezellen mit verschiedenen Konzentrationen an CTLA-4-Ig-FITC gefärbt und *via* FACS analysiert. Dabei wurden nur die induzierten Hefezellen betrachtet, von denen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean*) gebildet und abschließend die apparente Bindungsaffinität ( $K_D$ ) bestimmt wurde<sup>98</sup>. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.33 zusammengefasst.



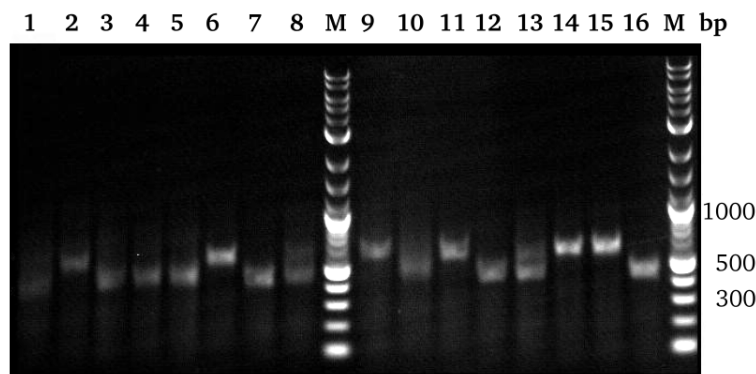
**Abb. 4.33:** Bindungsanalyse der dimerischen Miniproteinvarianten BibI-dimer-EK9 und BibI-dimer-EK10. (A) Analyse der Oberflächenpräsentation *via* FACS. Das cMyc-Epitop wurde mit spezifischen Antikörpern markiert. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL1 (FITC), **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse. **R1:** fluoreszenzmarkierte Hefezellen. (B) Hefetitration zur Bestimmung der Bindungsaffinität der dimerischen Miniproteinvarianten BibI-dimer-EK9 und BibI-dimer-EK10. Die konzentrationsabhängige Bindung der beiden Varianten an CTLA-4-Ig-FITC wurde in einer Einfachbestimmung getestet. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

Wie in Abb. 4.33-A gezeigt ist, konnten die dimerischen Miniproteinvarianten durch eine spezifische Markierung des C-terminalen cMyc-Epitops auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Die markierten Hefezellen sind im Bereich R1 (Abb. 4.33-A) zu sehen, welche eine starke relative Fluoreszenz aufweisen. Für die beiden Einzelklone, BibI-dimer-EK9 sowie BibI-dimer-EK10, ergab sich eine Bindungsaffinität von etwa 25 μM und 3,8 μM (Abb. 4.33-B), was in etwa der Bindungskonstante der Ausgangsvariante MC-CT-010 entsprach (4.3.2.1, Abb. 4.21). Dies zeigt, dass es möglich ist aus der Bibliothek I dimerische Miniproteine zu identifizieren. Jedoch zeigten die isolierten Varianten, unter Verwendung der Hefetitration als Analysemethode, keine Verbesserung der Bindungsaffinität gegen CTLA-4.



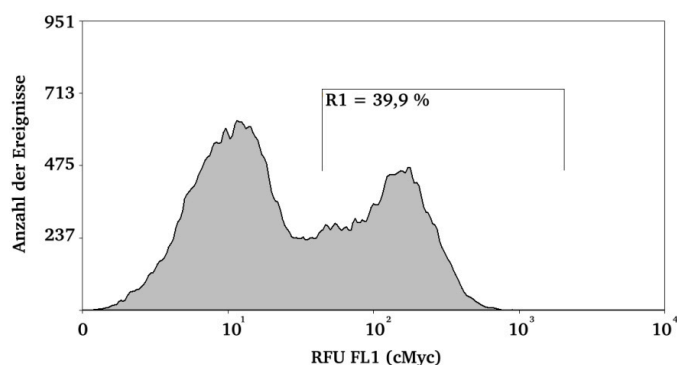
#### 4.4.1.2 Erstellung und Selektion der dimerischen Bibliothek II

Die dimerische Miniprotein-Bibliothek II (Abb. 4.26-B, Bibliothek II) wurde in Zusammenarbeit mit Simon Krah während seiner Bachelorarbeit generiert<sup>219</sup>. Die Klonierung der ersten oMCoTI(SloII)-Bibliothek erfolgte dabei über eine Transformation mit *E. coli* und die zweite oMCoTI(SloII)-Bibliothek wurde über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* EBY100 eingebracht (3.1.8), so dass am Ende die dimerische Variantenbibliothek II in Hefezellen vorlag<sup>219</sup>. Die Auswertung über Kolonie-PCR (3.3.4.2) ergab, dass von 16 getesteten Klonen 7 Einzelklone ein PCR-Produkt mit der Länge von etwa 584 bp (Abb. 4.34) enthielten. Die restlichen 9 Einzelklone trugen die genetische Information für nur ein Miniprotein (Abb. 4.34). Die Bibliothek II enthielt somit etwa  $7 \cdot 10^8$  Klone, von denen ca.  $2,6 \cdot 10^8$  Klone (37,5 %) die genetische Information für zwei Miniproteine enthielten.



**Abb. 4.34:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR EBY100 pCT-dimeric-oMCoTI(SloII). Als Oligonukleotid-Primer dienen pCT-Seq-neu-up und pCT-Seq-lo. M: 2-Log DNA Ladder. 1-16: Die getesteten Einzelklone 1 bis 16. Modifiziert nach Krah, 2012<sup>219</sup>.

Anschließend wurde mit der Durchmusterung der Bibliothek nach CTLA-4-bindenden Varianten begonnen. Hierfür wurde die dimerische Bibliothek II in 1 L SDCAA-Medium (2.9.2) über Nacht bei 30 °C kultiviert (3.1.5) und am nächsten Tag die Zelldichte ermittelt (3.1.6). Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in 1 L SGCAA-Medium (2.9.2) inokuliert, über Nacht bei 20 °C kultiviert und induziert (3.1.9). Die Vollängenexpression der Miniproteine wurde vor jeder Sortierung über eine cMyc-Epitop-Markierung (Abb. 4.35) via Antikörper nachgewiesen (3.5.1). Wie in Abb. 4.33 gezeigt ist, konnten die Miniproteinvarianten durch eine spezifische Markierung des C-terminalen cMyc-Epitops auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Im Bereich R1 (Abb. 4.35) sind die markierten Hefezellen zu sehen, welche eine starke relative Fluoreszenz aufweisen.

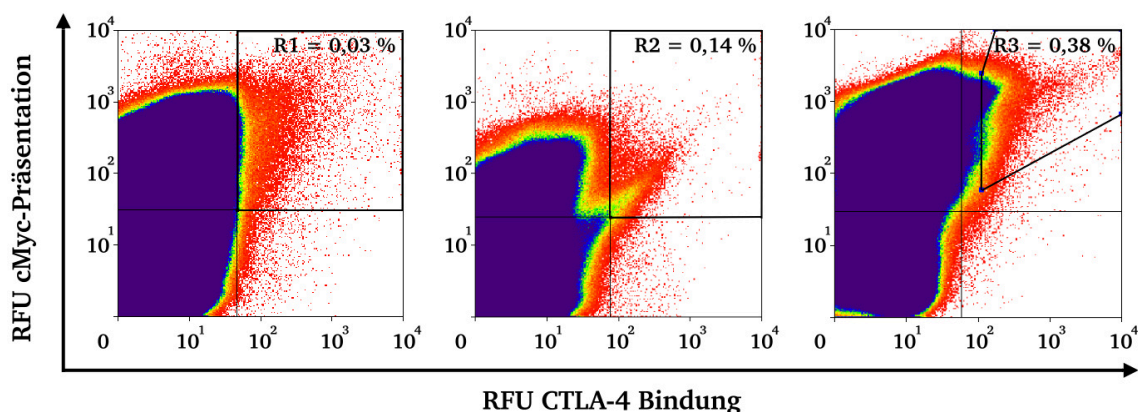


**Abb. 4.35:** Analyse der Oberflächenpräsentation der dimerischen Bibliothek II *via* FACS. Das cMyc-Epitop wurde mit spezifischen Antikörpern markiert. **x-Achse:** relative Fluoreszenz FL1 (FITC), **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse. **R1:** fluoreszenzmarkierte Hefezellen. Modifiziert nach Krah, 2012<sup>219</sup>.

Die Durchmusterung der Bibliothek erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS, 3.5.3). Vor jeder Sortierungsrunde erfolgte eine Markierung der Hefezellen mit dem cMyc-Antikörper zur Kontrolle der Oberflächenpräsentation (3.5.1). Für die eigentliche Sortierung wurde eine Zweifachmarkierung durchgeführt und die Hefezellen anschließend sortiert. Dafür wurden die Zellen in allen drei Sortierungsrunden mit CTLA-4-Ig-FITC (3.4.6.1) und den Antikörpern anti-cMyc, anti-Maus-Biotin sowie Streptavidin-Allophycocyanin (S-APC) gefärbt. Nach jeder Sortierungsrunde wurde von den separierten Hefezellen ein serieller Verdünnungsausstrich auf SDCAA-Agar-Platten (2.9.2) angefertigt, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Selektion über den Auxotrophiemarker zu gewährleisten. Außerdem wurde von den separierten Hefezellen eine Gefrierkultur zur langfristigen Lagerung der Selektionsrunden angefertigt (3.1.5) und die Hefezellen anschließend erneut kultiviert (3.1.5) sowie induziert (3.1.9). Die Daten und Ergebnisse dieser Durchmusterung sind in Tab. 4.6 und Abb. 4.36 gezeigt.

**Tab. 4.6:** FACS-Daten der Durchmusterung der dimerischen Bibliothek II auf CTLA-4.

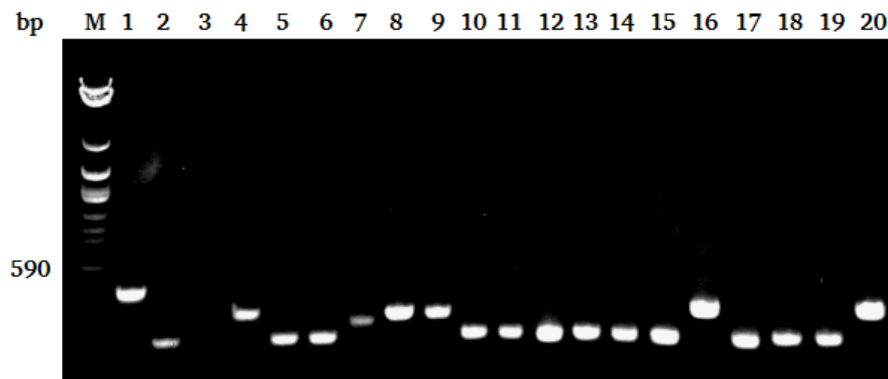
	Runde I	Runde II	Runde III
<b>Total</b>	$2 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$
<b>R1 bis R3</b>	$6,5 \cdot 10^4$ 0,03 %	$1,6 \cdot 10^4$ 0,14 %	$7,8 \cdot 10^4$ 0,38 %
<b>CTLA-4-Ig [<math>\mu</math>M]</b>	1	1	1
<b>Markierung</b>	CTLA-4-Ig-FITC $\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-BT, S-APC	CTLA-4-Ig-FITC $\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-BT, S-APC	CTLA-4-Ig-FITC $\alpha$ -cMyc, $\alpha$ -M-BT, S-APC



**Abb. 4.36:** FACS-Daten der Durchmusterung der dimerischen Bibliothek II auf CTLA-4. Gezeigt sind die drei Sortierungsrunden (von links nach rechts). Für die Selektion erfolgte eine Zweifarbenmarkierung der induzierten Hefebibliothek. Gezeigt sind zweidimensionale Dotplots, wobei der Farbwechsel von Rot nach Blau eine Zunahme der Zellzahl in dem entsprechenden Bereich signalisiert. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der Bindung von CTLA-4-Ig, **y-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz der cMyc-Präsentation, **R1-R3:** separierte Hefezellen.

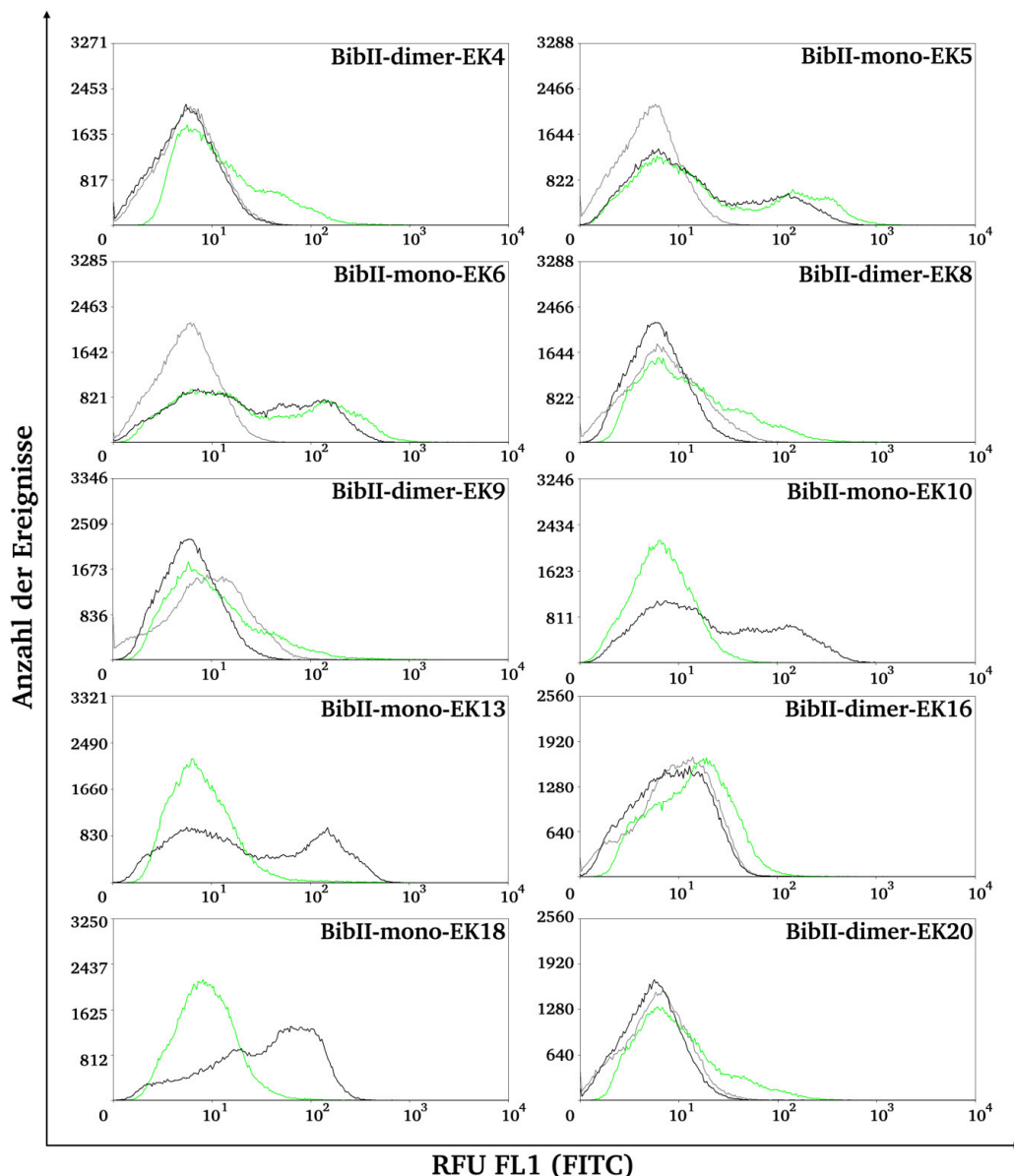
Insgesamt wurden drei Sortierungsrunden durchgeführt, wobei keine Resortierung der separierten Hefezellen erfolgte und die CTLA-4-Ig-Konzentration konstant bei  $1\mu\text{M}$  beibehalten wurde (Tab. 4.6). In Abb. 4.36 werden die Histogramme der drei Sortierungsrunden gezeigt, wobei Hefezellen aussortiert wurden, die durch CTLA-4-Ig (nach rechts) und den cMyc-Antikörper (nach oben) markiert werden konnten, um gleichzeitig Bindung des Zielproteins sowie Oberflächenpräsentation der Miniproteine zu gewährleisten. In der dritten Sortierungsrunde ist eine deutliche Population CTLA-4-bindender Hefezellen zu erkennen, die eine klare Verschiebung der relativen Fluoreszenz (RFU) nach oben (cMyc-Präsentation) und nach rechts (CTLA-4-Ig-FITC) aufweisen (Abb. 4.36).

Nach der 3.Sortierungsrunde wurde eine Kolonie-PCR (3.3.4.2) mit den Primern pCT-lib-fwd sowie pCT-lib-rev (2.4) durchgeführt und über Agarosegelelektrophorese (3.2.4) analysiert, um die Anreicherung von dimerischen Miniproteinen zu überprüfen. Von den 20 getesteten Einzelklonen zeigten fünf Klone (25 %) das korrekte *insert* mit einer Länge von etwa 373 bp (Abb. 4.37). Die restlichen 15 Einzelklone zeigten entweder das Ausgangsplasmid, welches die genetische Information für nur ein Miniprotein enthielt, oder Längenvariationen, die nicht zugeordnet werden konnten (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37:** Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v)) der Kolonie-PCR EBY100 pCT-dimeric-oMCoTI(SloII). Als Oligonukleotid-Primer dienten pCT-Seq-neu-up und pCT-Seq-lo. **M:** 2-Log DNA Ladder. **1-20:** Die getesteten Einzelklone 1 bis 20.

Für die Bindungsanalyse der auf CTLA-4-Ig isolierten Hefezellen wurden zehn Einzelklone kultiviert (3.1.5) und die Präsentation der Miniproteinvarianten induziert (3.1.9). Von den zehn induzierten Einzelklonen trugen fünf Klone die genetische Information für zwei Miniproteine und fünf Klone die genetische Information für ein Miniprotein. Die Charakterisierung der Einzelklone erfolgte über eine Einfachmarkierung, in welcher die Präsentation des cMyc-Epitops mit den Antikörpern anti-cMyc sowie anti-Maus-FITC (3.5.1) und anschließend die Bindung von CTLA-4 mit 1  $\mu$ M CTLA-4-Ig-FITC geprüft wurde (3.5.2). Bei den Einzelklonen, die eine Bindung an CTLA-4-Ig-FITC zeigten, wurde als Kontrolle 1  $\mu$ M Cetuximab-FITC verwendet, um die Bindung der Miniproteine an den Fc-Teil von CTLA-4-Ig auszuschließen. Die FACS-Histogramme sind in Abb. 4.38 zu sehen.

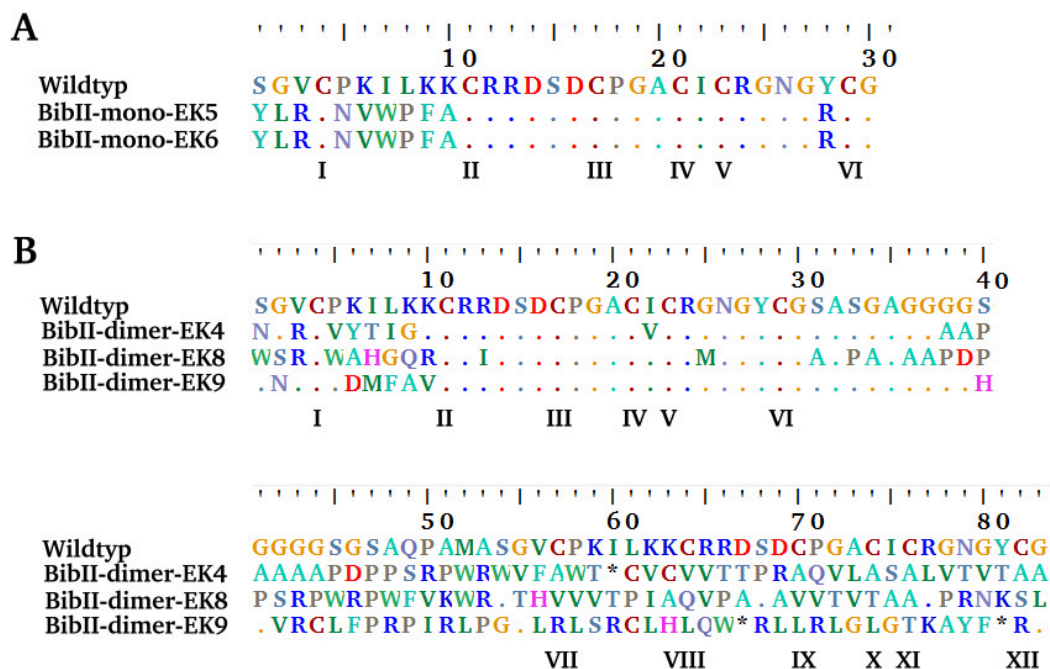


**Abb. 4.38:** FACS-Daten zur Bindungsanalyse der isolierten monomeren und dimeren Einzelklone. Bei jedem Einzelklon wurden die cMyc-Präsentation (**schwarz**) sowie die CTLA-4-Bindung (**grün**) getestet. Bei Einzelklonen, die eine Bindung mit CTLA-4-Ig-FITC zeigten, wurde Cetuximab-FITC (**grau**) als Kontrolle verwendet. **x-Achse:** logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenz FL1 (FITC), **y-Achse:** Anzahl der gemessenen Ereignisse.

Eine deutliche cMyc-Präsentation (schwarz) zeigten nur die fünf monomeren Einzelklone (BibII-mono-EK5, BibII-mono-EK6, BibII-mono-EK10, BibII-mono-EK13 und BibII-mono-EK18). Die Klone BibII-mono-EK5 und BibII-mono-EK6 zeigten ebenfalls eine deutliche Verschiebung nach rechts bei der Markierung mit CTLA-4-Ig-FITC (grün), aber wiesen keine Verschiebung mit Cetuximab-FITC (grau) auf (Abb. 4.38). Die anderen monomeren Einzelklone BibII-mono-EK10, BibII-mono-EK13 sowie BibII-mono-EK18 zeigten keine CTLA-

4-Ig-FITC Bindung (Abb. 4.38, grün). Die dimerischen Einzelklone BibII-dimer-EK4, BibII-dimer-EK8, BibII-dimer-EK9, BibII-dimer-EK16 sowie BibII-dimer-EK20 zeigten eine unspezifische Markierung mit CTLA-4-Ig-FITC (Abb. 4.38, grün).

Die monomeren Klone BibII-mono-EK5 sowie BibII-mono-EK6 und alle dimeren Klone wurden via Sequenzierung mit Hilfe des Oligonukleotids pCT-Seq-lo (2.4) durch die Firma Seqlab (Göttingen) analysiert. Die Analyse der Sequenzen und das Sequenzalignment erfolgten mit den Programmen ApE sowie BioEdit. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.39 dargestellt.



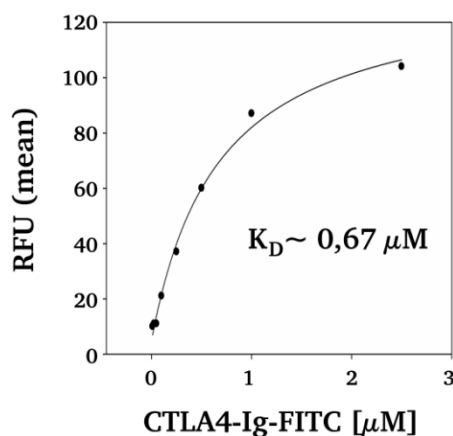
**Abb. 4.39:** (A) Sequenzvergleich der monomeren Einzelklone mit dem MCoTI-II Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp-Aminosäuren an. Die Cysteine I bis VI sind in Schwarz unter den Sequenzen durchnummeriert. (B) Sequenzvergleich der dimeren Einzelklone mit dem dimeren Wildtyp. Punkte deuten Wildtyp-Aminosäuren an. Die Cysteine I bis XII sind in Schwarz unter den Sequenzen durchnummeriert. Die Sequenzvergleiche wurden per BioEdit erstellt.

Die Sequenzen der Klone BibII-dimer-EK16 sowie BibII-dimer-EK20 waren nicht lesbar. Die Sequenzen der Klone BibII-dimer-EK4, BibII-dimer-EK8 und BibII-dimer-EK9 enthielten *frameshifts* im Glycin-Serin-Linker, was durch einen Fehler bei der homologen Rekombination in der Hefe zustande gekommen sein kann, so dass die genetische Information des C-terminalen Miniproteins fehlte und somit die Präsentation von dimerischen Miniproteinen unmöglich machte (Abb. 4.39-B). Die Klone BibII-mono-EK5 und BibII-mono-EK6 waren sequenzidentisch (Abb. 4.39-A). In Abb. 4.39-A ist zu erkennen, dass diese Miniproteinvariante keinerlei Sequenzübereinstimmungen in der Inhibitorschleife (PKILKK)

---

und in der vorderen Region (SGV) zum Wildtyp aufweist. In der hinteren Schleife (RGNGY) ist ein Austausch Y28R zu erkennen. Das Miniprotein BibII-mono-EK5/6 zeigt ebenfalls keine Sequenzübereinstimmung in der Inhibitorschleife oder der vorderen Region (SGV) mit der im Kapitel 4.2.1.1 isolierten Variante MC-CT-010 (Abb. 4.12-B).

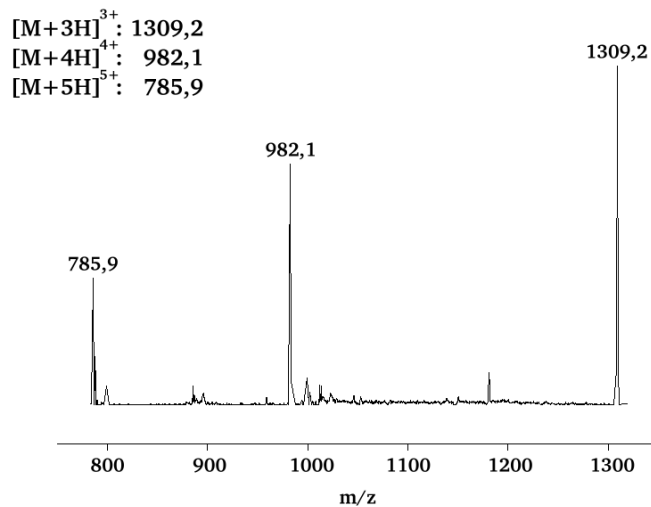
Anschließend wurde der Einzelklon BibII-mono-EK5/6 für die Bindungsanalyse kultiviert (3.1.5) und induziert (3.1.9). Die Charakterisierung und somit eine ungefähre Abschätzung der Bindungsaffinität erfolgte durch eine Hefetitration<sup>98</sup>. Die Hefezellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an CTLA-4-Ig-FITC (3.4.6.1) gefärbt und *via* FACS analysiert. Dabei wurden nur die induzierten Hefezellen betrachtet, von denen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean*) gebildet und abschließend die apparente Bindungsaffinität ( $K_D$ ) bestimmt wurde<sup>98</sup>. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.40 dargestellt.



**Abb. 4.40:** Hefetitration zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Miniproteinvariante BibII-mono-EK5/6. Die konzentrationsabhängige Bindung an CTLA-4-Ig-FITC wurde in einer Einfachbestimmung getestet. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

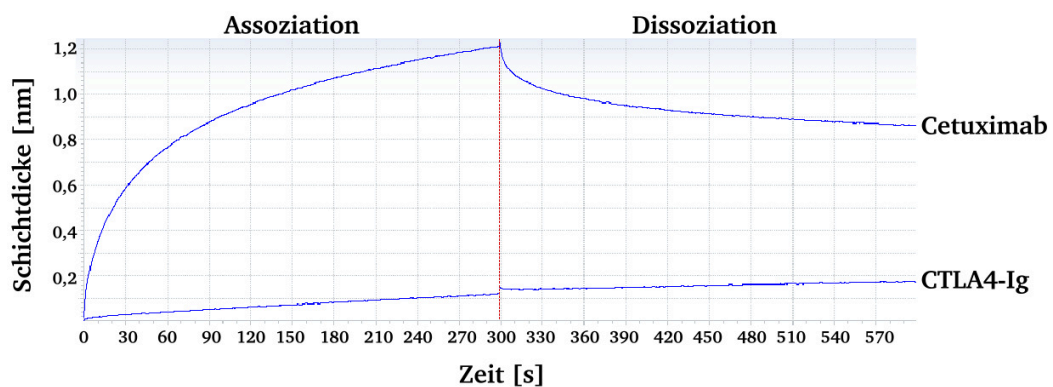
Für das Miniprotein BibII-mono-EK5/6 ergab sich eine Bindungsaffinität von etwa 670 nM (Abb. 4.40). Um die Spezifität und Bindungseigenschaften genauer zu analysieren, wurde die Variante BibII-mono-EK5/6 mittels Fmoc-basierter Festphasensynthese (3.4.7) hergestellt. Nach anschließender Biotin-Konjugation und oxidativer Faltung (3.4.8) des Knottins wurde das Syntheseprodukt *via* ESI-MS (3.4.10) auf vollständig verknüpfte Disulfidbrücken analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.41 dargestellt. Die errechnete Masse des gefalteten Miniproteins beträgt 3924,64 g/mol. Die Massenanalyse ergab eine Masse von etwa 3924,50 g/mol (Abb. 4.41), was eine Abweichung von 0,01 % entspricht.





**Abb. 4.41:** ESI-MS Daten der gefalteten Miniproteinvariante BibII-mono-EK5/6. Bei der ESI-MS Analyse ist das Masse-zu-Ladung-Verhältnis gezeigt.

Die biochemische Charakterisierung erfolgte mittels *bio-layer interferometry* (3.4.12). Hierfür wurden Streptavidin-Sensoren verwendet, die mit etwa 10  $\mu\text{g}$  Biotin-konjugiertem Miniprotein beladen wurden. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden die Sensoren entweder mit 2,5  $\mu\text{M}$  CTLA-4-Ig oder Cetuximab beladen (Assoziation) und anschließend wieder mit PBS gewaschen (Dissoziation). Die Ergebnisse der *bio-layer interferometry* (BLI) sind in Abb. 4.42 zusammengefasst.



**Abb. 4.42:** Bestimmung der Bindungseigenschaften der Miniproteinvariante BibII-mono-EK5/6 mittels *bio-layer interferometry* (BLI). Bei dieser Methode wird die Schichtdickenveränderung über die Zeit dargestellt.

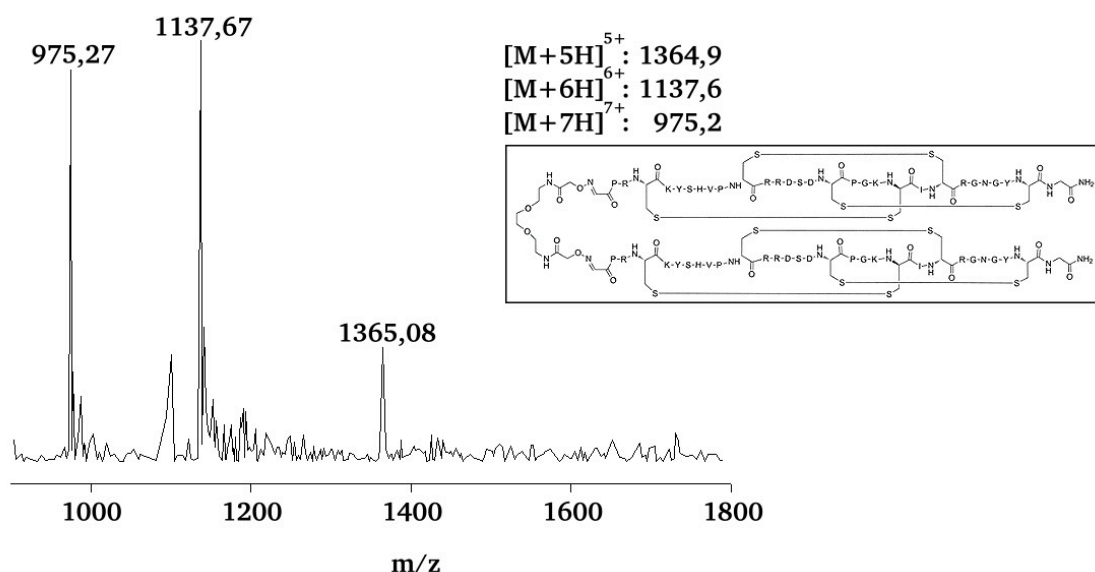
Es ist erkennbar, dass die chemisch synthetisierte Variante BibII-mono-EK5/6 in der BLI-Analyse unspezifisch an die Kontrolle Cetuximab und kaum messbar an CTLA-4-Ig bindet



(Abb. 4.42). Es kann festgestellt werden, dass BibII-mono-EK5/6 kein spezifischer CTLA-4-Binder und somit ein Fc-Teil bindendes Miniprotein ist.

#### 4.4.2 Chemische Dimerisierung des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010

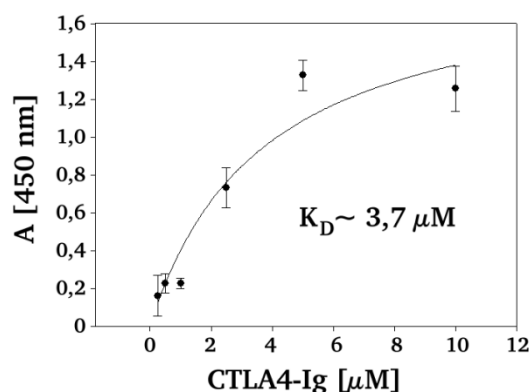
Parallel zur rekombinanten Dimerisierung mittels *yeast display* (4.4.1) wurde eine chemische Dimerisierung von Miniproteinen durchgeführt. Dazu wurde das chemisch synthetisierte, CTLA-4-bindende Miniprotein MC-CT-010 verwendet und über einen Polyethylenglycol(PEG)-Linker, wie in Abb. 4.43 im schwarzen Kasten dargestellt, zu einem Dimer verknüpft. Die Herstellung des Dimers (SH-330) sowie die Analyse *via* ESI-MS wurde von Dipl. Ing. Sebastian Hörner durchgeführt. Die errechnete Masse beträgt 6819,86 g/mol. Die Massenanalyse ergab eine Masse von etwa 6819,50 g/mol (Abb. 4.43), was eine Abweichung von 0,01 % entspricht. Das über RP-HPLC gereinigte Produkt SH-330 wurde mir anschließend für weitere Tests zur Verfügung gestellt.



**Abb. 4.43:** ESI-MS Daten des Miniprotein-Dimers (SH-330). Bei der ESI-MS Analyse ist das Masse-zu-Ladung-Verhältnis gezeigt. Die Strukturformel des Dimers ist im schwarzen Kasten dargestellt.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Miniprotein-Dimers SH-330 wurde ein ELISA (3.3.6) durchgeführt. Dafür erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit je 2  $\mu\text{g}$  SH-330 pro Kavität über Nacht. Nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) BSA in PBS wurden verschiedene Konzentrationen (0 bis 10  $\mu\text{M}$ ) von CTLA-4-Ig pro Kavität zugegeben. Die immunologische Detektion erfolgte über den Antikörper anti-H-Fc-HRP (1:5.000 in 1% (w/v)

BSA in PBS) und TMB-Lösung. Nach 5 min wurde die Entwicklung mit einer verdünnten HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen. In Abb. 4.44 ist zu sehen, dass CTLA-4 konzentrationsabhängig an das Dimer SH-330 bindet. Die Bindungskurve wurde mit Hilfe von SigmaPlot erstellt und die apparente Bindungskonstante ( $K_D$ ) berechnet<sup>98</sup>. Für die Variante SH-330 ergab sich eine Bindungsaffinität von etwa 3,7  $\mu\text{M}$ , was der ermittelten Bindungskonstante des synthetisch hergestellten Miniproteins MC-CT-010 in Kapitel 4.3.2.1 (Abb. 4.21) entsprach. Durch die Dimerisierung der Miniproteinvariante MC-CT-010 über einen PEG-Linker konnte somit keine verbesserten Bindungseigenschaften erzielt werden.



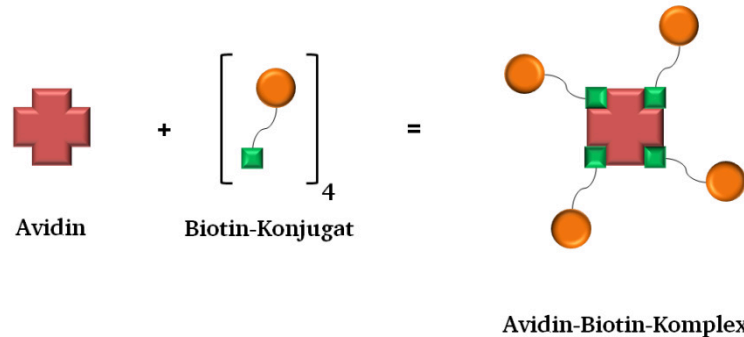
**Abb. 4.44:** ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Miniprotein-Dimers SH-330. Die konzentrationsabhängige Bindung von SH-330 an CTLA-4 wurde in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über den Antikörper anti-H-Fc-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

#### 4.4.3 Oligomerisierung des CTLA-4-bindenden Miniproteins MC-CT-010 *via* NeutrAvidin

Da bei der Dimerisierung des Miniproteins MC-CT-010 mittels PEG-Linker (4.4.2) alles darauf hindeutete, dass die Wahl des Linkers zu kurz war, wurde der Avidin-Biotin-Komplex<sup>220</sup> zur Oligomerisierung der Variante MC-CT-010 und zum Austesten von größeren Abständen zwischen den Miniproteinen verwendet. Außerdem wurde in Kapitel 4.3.2.3 eine Bindungsverbesserung des Tetramers festgestellt, so dass der postulierte Aviditätseffekt durch die Oligomerisierung *via* Avidin-Biotin-Komplex untersucht werden sollte. Im Jahre 1963 wurden erste Untersuchungen zur Bindung zwischen Avidin und Biotin erfolgreich durchgeführt<sup>221</sup> und seitdem ist es ein altbekanntes System, was breitgefächert in der Molekularbiologie verwendet wird<sup>222</sup>. Das in dieser Arbeit verwendete NeutrAvidin (Pierce, Rockford, USA) ist eine deglykosylierte Variante von Avidin und weist im Gegensatz zu Streptavidin bzw. Avidin einen neutralen isoelektrischen Punkt auf<sup>223</sup>. In Abb. 4.45 ist

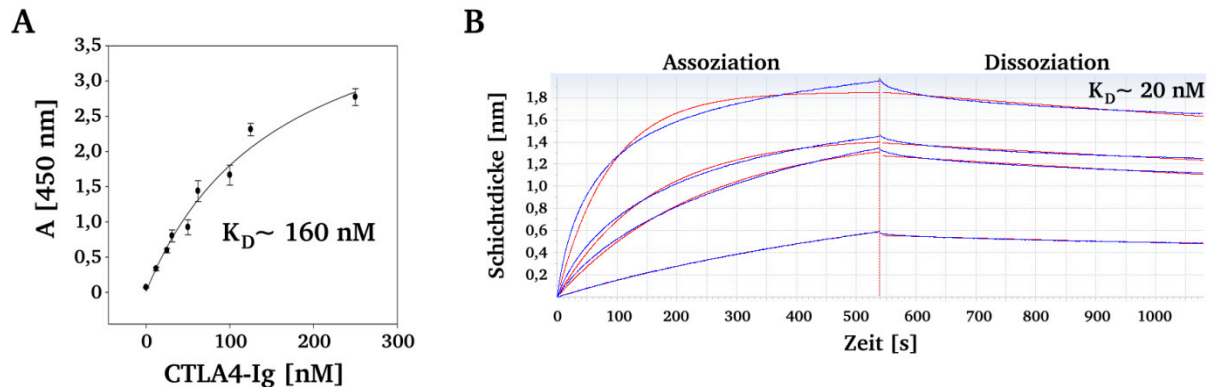
---

schematisch dargestellt, wie sich der Avidin-Biotin-Komplex aus einem Avidin und vier Biotin-Konjugaten zusammensetzt.



**Abb. 4.45:** Schematische Darstellung zur theoretischen Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes aus dem Avidin und den vier Biotin-Miniprotein-Konjugaten.

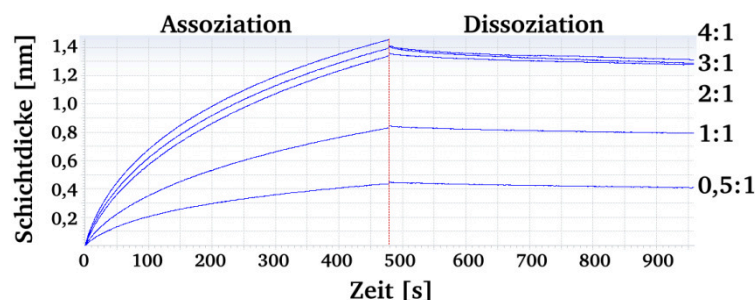
Bevor die Charakterisierung des oligomerisierten Miniproteins MC-CT-010 durchgeführt werden konnte, wurde der Avidin-Biotin-Komplex hergestellt. Dazu wurde Biotin-konjugiertes Miniprotein zusammen mit NeutrAvidin in einem molaren 4:1-Verhältnis in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde die Bindungsaffinität des Oligomers mittels ELISA (3.3.6) und *bio-layer interferometry* (BLI, 3.4.12) analysiert. Für den ELISA erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit dem Biotin-Avidin-Komplex und nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) Milchpulver in PBS wurden verschiedene Konzentrationen (0 bis 250 nM) von CTLA-4-Ig pro Kavität zugegeben. Die immunologische Detektion erfolgte über den Antikörper anti-H-Fc-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Nach 15 min wurde die Entwicklung mit einer verdünnten HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen. Für die Analyse mittels *bio-layer interferometry* wurden Protein A Biosensoren verwendet, die in PBS vorinkubiert wurden. Diese Biosensoren wurden mit CTLA-4-Ig in PBS (25 µg/200 µL) beladen und mit 1 % (w/v) Milchpulver in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Assoziation mit den verschiedenen Konzentrationen (50, 150, 300 und 600 nM) des Avidin-Biotin-Komplexes in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS und die Dissoziation mit 1 % (w/v) Milchpulver in PBS. Ein Kontrollminiprotein (600 nM), welches ebenfalls in einem molaren 4:1-Verhältnis mit NeutrAvidin vorinkubiert wurde und nicht an CTLA-4 bindet, diente als Referenzwert für das *fitting* und somit als Kontrolle, um unspezifische Bindungen ausschließen zu können. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.46 zusammengefasst.



**Abb. 4.46:** Charakterisierung der oligomerisierten Miniproteinvariante MC-CT-010 *via* NeutrAvidin. (A) ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Miniprotein-Oligomers. Die konzentrationsabhängige Bindung des Oligomers an CTLA-4 wurde in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über den Antikörper anti-H-Fc-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot. (B) *Bio-Layer Interferometry* (BLI)-Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Miniprotein-Oligomers mittels Octet RED System (ForteBio). Die roten Linien zeigen die Resultate des *fittings*, die von der Octet RED Software ermittelt wurden. Hier wird die Schichtdickenveränderung über die Zeit dargestellt.

In Abb. 4.46-A ist erkennbar, dass CTLA-4-Ig konzentrationsabhängig an den Avidin-Biotin-Komplex bindet. Mit Hilfe von SigmaPlot wurde die Bindungskurve erstellt und die apparente Bindungskonstante ( $K_D$ ) wurde berechnet<sup>98</sup>. Mit der Analyse *via* ELISA ergab sich eine Bindungsaffinität von etwa 160 nM. In Abb. 4.46-B ist ebenfalls eine konzentrationsabhängige Bindung des Avidin-Biotin-Komplexes an CTLA-4 zu sehen. Durch die Octet RED Software mit dem 1:1-*fitting*-Modell wurde eine Bindungsaffinität von etwa 20 nM ermittelt.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, welches molare Verhältnis von Miniprotein zu NeutrAvidin zu einem Aviditätseffekt führt. Hierzu wurde das Miniprotein mit NeutrAvidin im Verhältnis von 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1 sowie 4:1 in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS gemischt und anschließend mittels *bio-layer interferometry* (3.4.12) analysiert. Dazu wurden ebenfalls Protein A Biosensoren verwendet, die in PBS vorinkubiert wurden. CTLA-4 in PBS (25  $\mu$ g/200  $\mu$ L) wurde an die Biosensoren geladen, mit 1 % (w/v) Milchpulver in PBS wurde gewaschen und anschließend erfolgte die Assoziation mit den verschiedenen Miniprotein-Avidin-Mischungen in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS sowie die Dissoziation mit 1 % (w/v) Milchpulver in PBS. Die Ergebnisse, welche in Abb. 4.47 gezeigt sind, weisen auf einen Aviditätseffekt ab einem 2:1-Verhältnis (zwei Miniproteine zu einem NeutrAvidin) hin, da hier bereits eine vollständige Bindungssättigung, wie sie bei 4:1 (vier Miniproteine zu einem NeutrAvidin) vorliegt, erreicht wurde. Die beim 0,5:1-Verhältnis stattfindende Bindung resultiert aus der statistischen Verteilung von Miniprotein an NeutrAvidin.



**Abb. 4.47:** Analyse mittels *bio-layer interferometry* zur Bestimmung des MiniProtein-zu-Avidin-Verhältnisses, welches einen Aviditätseffekt bei der Bindung an CTLA-4-Ig zeigt. Bei dieser BLI-Methode wird die Schichtdickenveränderung über die Zeit gemessen.

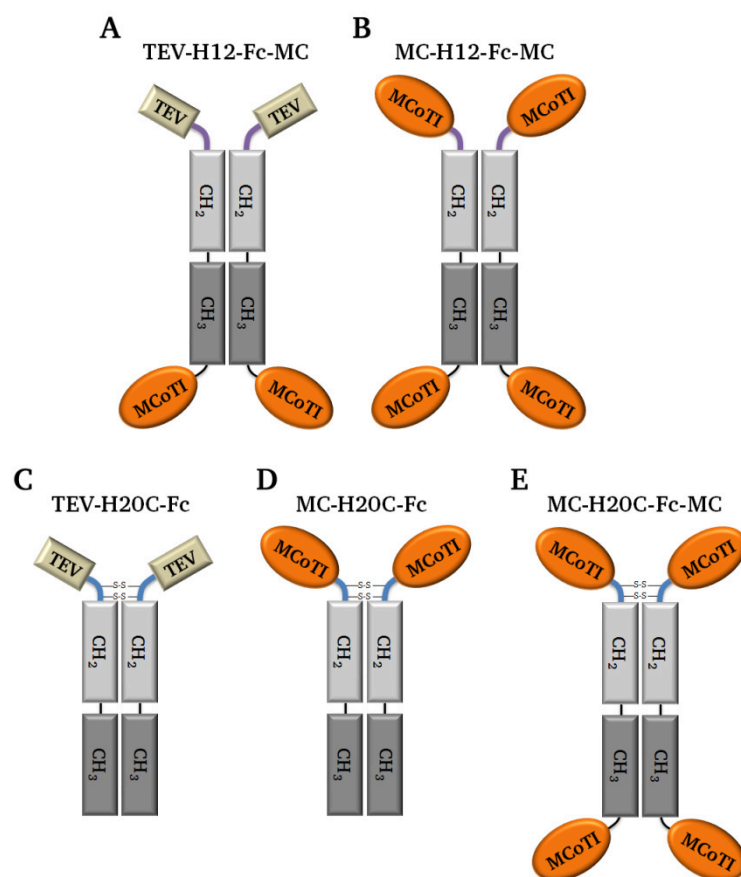
#### 4.4.4 Oligomerisierung des CTLA-4-bindenden MiniProteins MC-CT-010 über rekombinante Fusion an einen humanen Fc-Teil

Die Oligomerisierung *via* Avidin und der dadurch entstandene Aviditätseffekt konnten in Kapitel 4.4.3 erfolgreich gezeigt werden. Avidin ist jedoch ein ungeeignetes Grundgerüst für Therapeutika, da es durch das retikulohistiozytäre System (RHS) über die Leber schnell aus dem Körperkreislauf ausgeschieden wird<sup>224</sup>. Dieser Aspekt und der damit verbundene klinische Nutzen von Avidin zur besseren Entfernung von radiomarkierten und biotinylierten monoklonalen Antikörpern aus dem Organismus konnte bereits 1994 festgestellt werden<sup>225</sup>.

Um den vorhandenen Aviditätseffekt erneut aufzugreifen, wurde die MiniProteinvariante MC-CT-010 rekombinant an die Fc-Region des humanen IgG1-Moleküls fusioniert. Dies wurde bereits erfolgreich mit einer Vielzahl von Molekülen<sup>226</sup>, unter anderem auch mit dem Knottin EETI<sup>61</sup>, durchgeführt. Monomere sowie kleine Proteine werden aufgrund ihrer Größe und ihrer Serumhalbwertszeit schnell aus dem Körper über die Niere oder durch proteolytischen Abbau entfernt. Fc-basierte Fusionsproteine haben durch ihre homodimere Struktur, was mit einem höheren Molekulargewicht einhergeht, eine verbesserte Halbwertszeit sowie Serumstabilität<sup>227</sup> und können somit als Therapeutikum dienen.

In dieser Arbeit wurden die MiniProteine rekombinant *N*- und/oder *C*-terminal an die Fc-Region fusioniert, was in Abb. 4.48 schematisch dargestellt ist. Das Fusionsprotein TEV-H20C-Fc (Abb. 4.48-A) diente in den folgenden Experimenten als Kontrolle, um unspezifische Bindungen des Linkers oder der Fc-Region in den später durchgeführten Bindungsanalysen auszuschließen. Es wurden zwei verschiedene Linker (H12 und H20C) verwendet, um den Einfluss dieser auf die Faltung, Stabilität und Bindungsgeigenschaften der MiniProtein-Fc-Fusionsproteine zu untersuchen. Der H20C-Linker (Abb. 4.48-C bis Abb. 4.48-E, Blau) trägt die 20 natürlichen Aminosäuren (EPKSCDKTHTCPPCPAPELL) der menschlichen IgG1-Hinge-

Region. Da die Miniproteinvariante MC-CT-010 selbst sechs Cysteine enthält, wurde zusätzlich der H12-Linker verwendet (Abb. 4.48-A und Abb. 4.48-B, Lila). Dieser wurde erfolgreich bei der Fusion von bicyclischen Peptiden mit einem Antikörper-Fc-Fragment getestet und trägt 12 Aminosäuren (HTSPSPAPELL) der natürlichen IgG1-Hinge-Region, wobei die zwei Cysteine gegen Serin ausgetauscht sind<sup>228</sup>. Durch die genetische Fusion des Miniproteins an den N- und/oder C-Terminus der Fc-Region sollten dimere (Abb. 4.48-A und Abb. 4.48-D) und tetramere (Abb. 4.48-B und Abb. 4.48-E) Fusionsproteine generiert werden, deren Bindungseigenschaften anschließend gegen CTLA-4-Ig getestet wurden.



**Abb. 4.48:** Schematische Darstellung der in *E. coli* klonierten und in HEK293-Zellen produzierten Miniprotein-Fc-Fusionen. TEV-H12-Fc-MC (A) und MC-H12-Fc-MC (B) haben einen H12-Linker, der aus 12 Aminosäuren der natürlichen Hinge-Region besteht, wobei die Cysteine durch die Aminosäure Serin ausgetauscht sind. TEV-H20C-Fc (C), MC-H20C-Fc (D) und MC-H20C-Fc-MC (E) haben einen H20C-Linker, der aus 20 Aminosäuren der natürlichen Hinge-Region besteht, wobei die natürlichen Cysteine enthalten sind und sich somit Disulfidbrücken bilden können. Der H12-Linker ist in Lila und der H20C-Linker in Blau dargestellt. Die Miniproteine sind in Orange und die Fc-Region in Grau gezeigt.



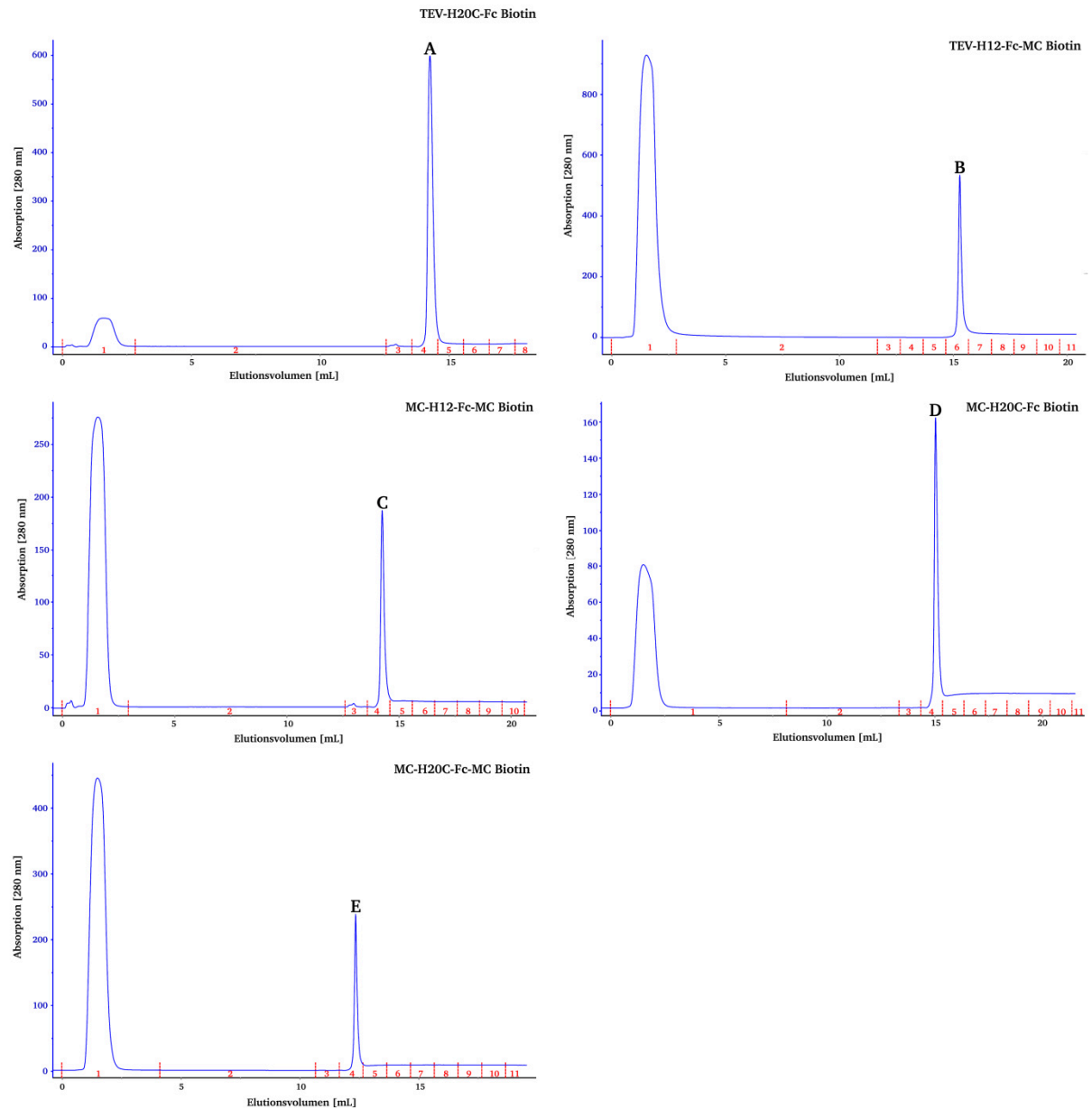
---

Zur Generierung der verschiedenen Miniprotein-Fc-Fusionsproteine wurden die zu integrierenden DNA-Fragmente benötigt. Das DNA-Fragment, welches die genetische Information der Miniproteinvariante MC-CT-010 und dem H20C-Linker kodiert, wurde über PCR (3.3.3) mit den Oligonukleotid-Primern MCOpt-for, MCOpt-H20C-intern und H20C-Cys-rev (2.4) amplifiziert. Hierbei wurde kein *template* verwendet, da die Primer das vollständige, sequenzoptimierte PCR-Produkt durch Überlappung bildeten. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Daten nicht gezeigt) überprüft, die PCR-Reaktionen wurden vereinigt und *via* Phenol-Chloroform (3.2.3) sowie anschließender Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *NheI* unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Reaktionsbedingungen verdaut (3.3.1). Die Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Daten nicht gezeigt) analysiert und das PCR-Produkt anschließend *via* Phenol-Chloroform (3.2.3) sowie Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung (3.2.2) gereinigt. Für die Klonierung wurde außerdem gespaltenes und gereinigtes pEXPR-Vektorfragment benötigt. Die Plasmide pEXPR-TEV-H20C-Fc und pEXP-TEV-H20C-Fc-MC, welcher C-terminal die genetische Information der Miniproteinvariante MC-CT-010 enthielt, wurden von M. Sc. Stephan Dickgießer zur Verfügung gestellt. Diese beiden Vektoren wurden nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *NheI* unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- sowie Reaktionsbedingungen verdaut (3.3.1). Die Restriktionen, durch die bei beiden Vektoren die TEV-Schnittstelle entfernt wurde, wurden mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4, Daten nicht gezeigt) überprüft und die Vektor-Fragmente über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System gereinigt (3.2.6). Danach erfolgte die Ligation des gespaltenen Plasmide mit dem gespaltenen DNA-Fragment (3.3.2). *E. coli* DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert (3.1.6) und die Klonierung durch eine Kolonie-PCR (3.3.4.1) überprüft. Dafür wurden jeweils zehn Einzelklone mit den Oligonukleotid-Primern pEXPR-Seq-for und pEXPR-Seq-lo getestet (2.4) sowie mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Plasmid-DNA der Klone mit korrekter *insert*-Größe wurde mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System präpariert (3.2.7.1) und mit Hilfe des Oligonukleotids pEXPR-Seq-lo (2.4) durch die Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert. Beide Analysen zeigten eine korrekte Sequenz, so dass mit den Klonen weitergearbeitet und die Expression in HEK293-Zellen durchgeführt werden konnte. Für die Expression, die von M. Sc. Stephan Dickgießer durchgeführt wurde, wurden die gereinigten Plasmide benötigt. Dafür wurden *E. coli* DH5α mit den Vektoren pEXPR-MC-H20C-Fc, pEXPR-MC-H20C-Fc-MC, pEXP-TEV-H20C-Fc, pEXPR-TEV-H12-Fc-MC sowie

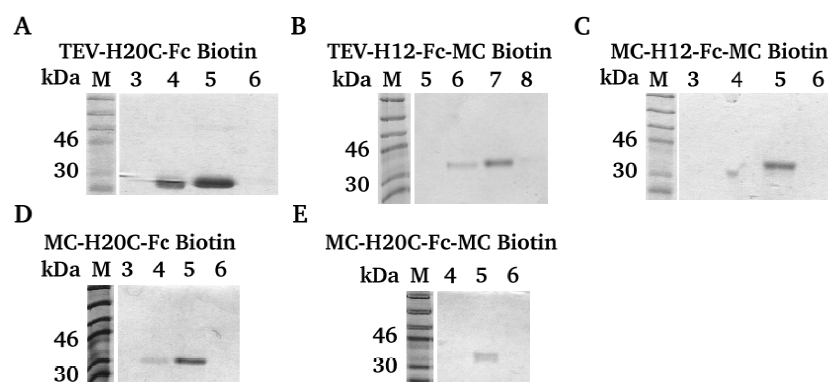
---

pEXPR-MC-H12-Fc-MC transformiert (3.1.7), wobei die Plasmide pEXP-TEV-H20C-Fc, pEXPR-TEV-H12-Fc-MC sowie pEXPR-MC-H12-Fc-MC von M. Sc. Stephan Dickgießer zur Verfügung gestellt wurden. Die Einzelklone wurden auf ampicillinhaltigen dYT-Agar-Platten selektiert (2.9.1) und jeweils ein positiver Klon wurde dann in 100 mL ampicillinhaltigem dYT-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert (3.1.1) und am nächsten Tag sedimentiert. Anschließend erfolgte die Isolierung und Reinigung der Vektoren mittels *Pure Yield<sup>TM</sup> Plasmid Midiprep System* (3.2.7.2). Die gereinigten Plasmide wurden an M. Sc. Stephan Dickgießer gegeben. Anschließend führte er die Transfektion der HEK293-Zellen und die Expression der verschiedenen Fc-Fusionsproteine in den HEK293-Zellen durch. Die HEK293-Zellen sekretieren die Fusionsproteine ins Medium, so dass die Zellen nach der Produktion für 10 min bei 400 U/min sedimentiert wurden, die 30 mL Überstand sterilfiltriert und mit je 17 mL 20 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer (2.10) aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Fusionsproteine *via* Protein A Chromatographie (3.4.9.4) gereinigt und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.3) analysiert. Die Fusionsproteine waren nach der Reinigung noch stark verunreinigt (Daten nicht gezeigt). Sie wurden über Nacht einer Dialyse gegen PBS unterzogen (3.4.4) und anschließend am nächsten Tag biotinyliert (3.4.6.1), um sie bei den Bindungsanalysen nachweisen zu können. Die Biotin-markierten Fusionsproteine wurden daraufhin nochmals *via* Protein A Chromatographie (3.4.9.4) gereinigt und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.3) analysiert. Die Daten sind in Abb. 4.49 und Abb. 4.50 zusammengefasst.





**Abb. 4.49:** Daten zu den durchgeführten Protein A Chromatographien zur Reinigung der in HEK293-Zellen produzierten und Biotin-konjugierten Miniprotein-Fc-Fusionen. Biotin-konjugiertes TEV-H20C-Fc diene als Kontrolle. **A:** Elutionspeak des TEV-H20C-Fc Biotin-Konjugats, **B:** Elutionspeak des TEV-H12-Fc-MC Biotin-Konjugats, **C:** Elutionspeak des MC-H12-Fc-MC Biotin-Konjugats, **D:** Elutionspeak des MC-H20C-Fc Biotin-Konjugats, **E:** Elutionspeak des MC-H20C-Fc-MC Biotin-Konjugats.



**Abb. 4.50:** SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen der in HEK293-Zellen produzierten, mit Biotin markierten und über Protein A Chromatographie gereinigten Miniprotein-Fc-Fusionen (**B-E**). Biotin-konjugiertes TEV-H20C-Fc diente als Kontrolle (**A**). **M:** *Prestained Protein Marker*.

Eine Expression der Fc-Fusionsproteine in HEK293-Zellen war erfolgreich. Die FPLC-Chromatogramme (Abb. 4.49) und die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 4.50) zeigen, dass alle fünf biotinylierten Fc-Fusionsproteine mittels Protein A Chromatographie (3.4.9.4) isoliert werden konnten. Abschließend wurden die Produktionen über Nacht gegen PBS dialysiert (3.4.4) und die Proteinkonzentration bestimmt (3.4.5). Die ungefähren Proteinausbeuten aus 30 mL Kulturmedium sind in der Tab. 4.7 zusammengefasst.

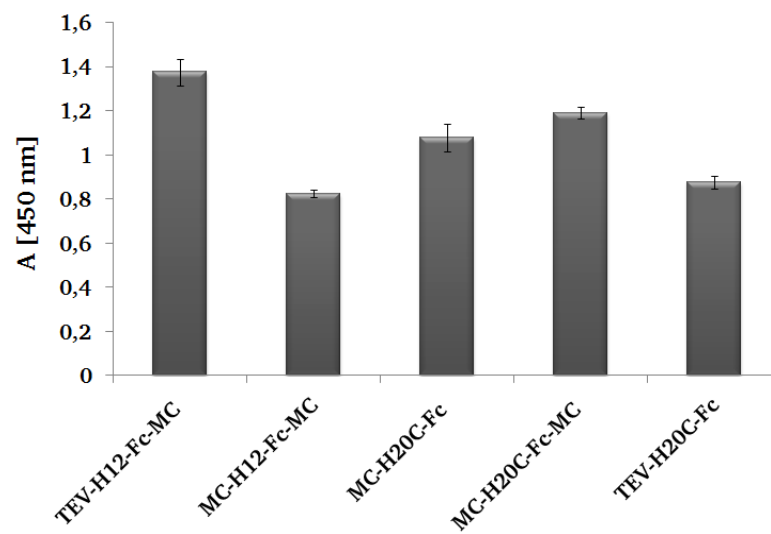
**Tab. 4.7:** Proteinausbeute nach der Expression der verschiedenen Fc-Fusionsproteinen aus 30 mL Kulturmedium mittels HEK293-Zellen.

Fc-Fusionsprotein	Proteinmenge
TEV-H12-Fc-MC	0,04 mg
MC-H12-Fc-MC	0,06 mg
TEV-H20C-Fc	0,12 mg
MC-H20C-Fc	0,30 mg
MC-H20C-Fc-MC	0,13 mg

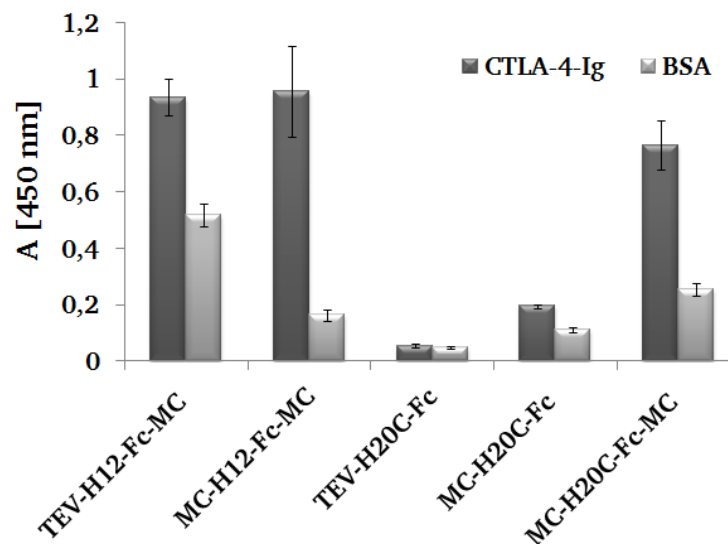
Nach der Proteinbestimmung wurden die Biotinylierung und die Bindungsspezifität der Fc-Fusionsproteine mittels ELISA (3.3.6) analysiert. Für die Analyse der Biotinylierung erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit den Biotin-konjugierten Fc-Fusionsproteinen (50  $\mu$ L einer 1  $\mu$ M Lösung pro Kavität). Für die Analyse der Bindungsspezifität erfolgte die Beschichtung der Platte mit je 12,5  $\mu$ g CTLA-4-Ig pro Kavität. Nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) BSA in PBS wurde die Analyse der Biotinylierung über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung detektiert und die Analyse der Bindungsspezifität wurde mit

jeweils 1  $\mu$ M Fc-Fusionsprotein in 1 % (w/v) BSA in PBS pro Kavität für 1 h inkubiert. Die immunologische Detektion erfolgte anschließend ebenfalls über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Nach 10 min wurde bei beiden Analysen die Entwicklung mit einer verdünnten HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.51 dargestellt.

**A**



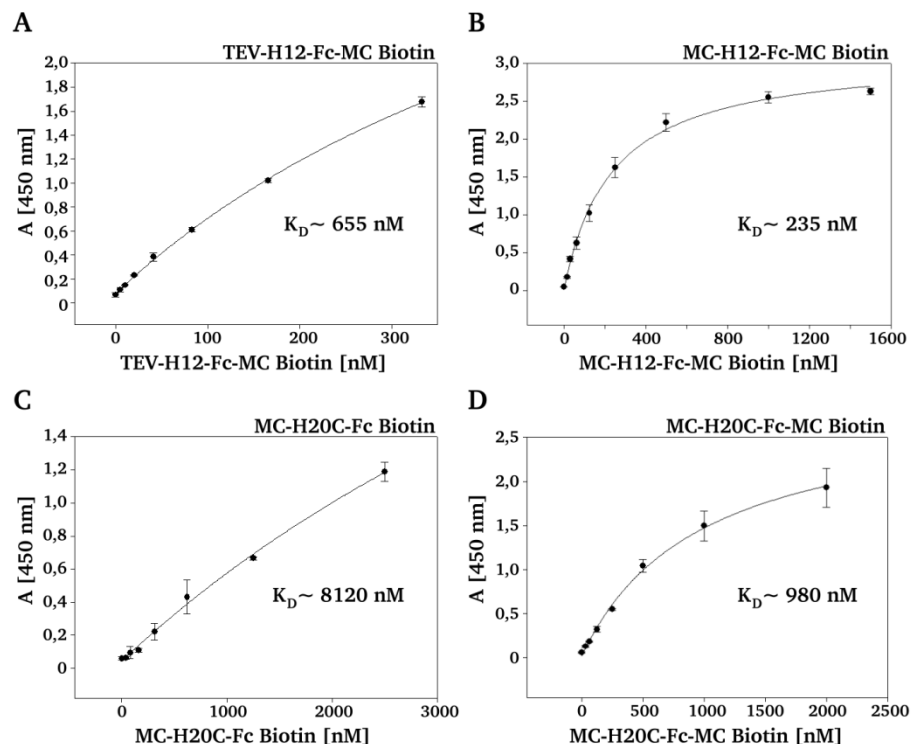
**B**



**Abb. 4.51:** Analyse der biotinylierten Fc-Fusionsproteinen via ELISA. **(A)** Bestätigung der Biotinylierung der Fc-Fusionsproteine. **(B)** Charakterisierung der Bindungsspezifität gegen CTLA-4 der verschiedenen Miniprotein-Fc-Fusionen. Das Fusionsprotein MC-H20C-Fc diente als Kontrolle. Die Bindung wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung.

In Abb. 4.51-A ist zu sehen, dass die Fc-Fusionsproteine erfolgreich biotinyliert wurden, so dass die Varianten in den weiteren Analysen über das Biotin mit ExtrAvidin-HRP nachgewiesen werden konnten. Alle vier Miniprotein-Fc-Fusionsproteine zeigten eine Bindung an CTLA-4-Ig (Abb. 4.50-B), was sich in der gemessenen Absorption bei 450 nm zwischen 0,1 und 1 widerspiegelt. Eine gewisse, unspezifische Bindung an BSA ist zu erkennen (Abb. 4.51-B). Die Kontrolle TEV-H20C-Fc zeigt keine Bindung an CTLA-4-Ig (Abb. 4.51-B).

Anschließend wurden die vier Miniprotein-Fc-Fusionsproteine näher mittels ELISA (3.3.6) untersucht, um eine ungefähre Bindungskonstante zu bestimmen. Hierfür erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit CTLA-4-Ig und nach anschließendem *blocking* mit 3 % (w/v) BSA in PBS wurden verschiedene Konzentrationen von Miniprotein-Fc-Fusionsproteinen pro Kavität zugegeben. Die immunologische Detektion erfolgte über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Nach 10 min wurde die Entwicklung mit einer verdünnten HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen. Die Ergebnisse der vier vermessenen Miniprotein-Fc-Fusionsproteine sind in Abb. 4.52 zu sehen.



**Abb. 4.52:** Charakterisierung der verschiedenen Miniprotein-Fc-Fusionen (A-D) *via* ELISA zur Bestimmung der Bindungsaffinität gegen CTLA-4. Die konzentrationsabhängige Bindung an CTLA-4-Ig wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung getestet, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben. Die immunologische Detektion erfolgte über ExtrAvidin-HRP (1:5.000) und TMB-Lösung. Die grafische Darstellung der Bindungskurve erfolgte mittels SigmaPlot.

---

In Abb. 4.52 ist deutlich erkennbar, dass die Fusionsproteine konzentrationsabhängig an CTLA-4-Ig binden. Die Bindungskurve wurde mittels SigmaPlot erstellt und die apparente Bindungskonstante ( $K_D$ ) berechnet<sup>98</sup>. Die Analyse *via* ELISA zeigte für die verschiedenen Fusionsproteine Bindungsaffinitäten im nanomolaren bis mikromolaren Bereich (Abb. 4.52). Die Variante MC-H12-Fc-MC (Abb. 4.52-B) zeigte die niedrigste Bindungskonstante mit etwa 235 nM, gefolgt von TEV-H12-Fc-MC (Abb. 4.52-A) mit ca. 655 nM und MC-H20C-Fc-MC (Abb. 4.52-D) mit etwa 980 nM. Das Fusionsprotein MC-H20C-Fc (Abb. 4.52-C) zeigte die höchste Bindungskonstante mit ca. 8,1  $\mu$ M.

#### 4.4.5 Diskussion der Ergebnisse

In diesem Abschnitt wurde die Möglichkeit eines entstandenen Aviditätseffekts und somit einer Affinitätsverbesserung über verschiedene Oligomerisierungsstrategien der Miniproteine untersucht. Zunächst wurden dafür die dimerischen Miniprotein-Variantenbibliotheken, Bibliothek I (4.4.1.1), bestehend aus dem isolierten CTLA-4-Binder MC-CT-010, einem Glycin-Serin-Linker sowie der oMCoTI(MCopt)-Bibliothek (Abb. 4.26-B, Bibliothek I), und Bibliothek II (4.4.1.2), bestehend aus zwei durch einen Glycin-Serin-Linker verbundenen oMCoTI(SloII)-Bibliotheken (Abb. 4.26-B, Bibliothek II), über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* generiert. Die Transformationseffizienz betrug bei Bibliothek I etwa 22 % und bei Bibliothek II ca. 37,5 % der Gesamtzellzahl. Die niedrige Effizienz könnte daraus resultieren, dass in den Plasmiden, welche bereits für die genetische Information eines Miniproteins codieren, die DNA eines weiteren Miniproteins über homologe Rekombination eingebracht wird. Die Wahrscheinlichkeit ist gegeben, dass die Hefen das erste Miniprotein mit dem zweiten ersetzen, da die Varianten C-terminal identische Bereiche aufweisen, welche homolog rekombinieren können. Die Sequenzierung der dimeren Miniproteinvarianten aus Bibliothek II bestätigte, dass ebenso *frameshifts* bei der homologen Rekombination im gewählten Glycin-Serin-Linker auftraten (Abb. 4.39), was dazu führte, dass keine vollständigen, dimerischen Varianten aus der Bibliothek II isoliert werden konnten. Bei der Bibliothek I wurde eine zweite Selektionsrunde durchgeführt (Daten nicht gezeigt), doch eine weitere Anreicherung von dimerischen Miniproteinvarianten blieb aus. Das aufgetretene Problem der Unterscheidung zwischen monomeren und dimeren Miniproteinen auf der Hefeoberfläche könnte über Integration eines weiteren Epitops gelöst werden, welches bei der homologen Rekombination des zweiten Miniproteins mit eingebracht wird. Die Generierung einer solchen Bibliothek wurde erfolgreich durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

---

Die isolierte und anschließend chemisch synthetisierte Miniproteinvariante BibII-mono-EK5/6 war kein spezifisches CTLA-4-Bindemolekül, sondern zeigte eine deutliche Bindung an humanes Fc (Cetuximab). Diese Kontrolle (Cetuximab-FITC) wurde im *yeast display* durchgeführt (Abb. 4.38), jedoch war keine Verschiebung der relativen Fluoreszenz und somit keine Bindung erkennbar. Der Verdacht liegt nahe, dass die Bindung im FACS nicht detektiert werden konnte, weil entweder das Cetuximab-FITC nicht mehr intakt war oder das Miniprotein BibII-mono-EK5/6 auf der Hefeoberfläche durch eine andere Konformation als in der Synthesvariante eine spezifischere Bindung aufwies.

In den vorgenommenen Analysen wurde deutlich, dass der richtige Abstand zwischen den Miniproteinen eine wichtige Rolle spielt, um eine Affinitätsverbesserung zu erzielen. Dies wäre eine Begründung dafür, weshalb keine verbesserten dimerischen Varianten aus den beiden kombinatorisch hergestellten Bibliotheken (4.4.1) selektiert werden konnten. Auch das chemisch über einen PEG-Linker hergestellte Dimer SH-330 (4.4.2) zeigte keine Affinitätssteigerung. Dagegen führte die Oligomerisierung mittels Avidin (4.4.3) sowie die rekombinante Expression als Fc-Fusion (4.4.4) zu einer starken Verbesserung der Affinität des Miniproteins MC-CT-010 zu CTLA-4 und zeigten einen deutlichen Aviditätseffekt. Für die Oligomerisierung *via* Avidin konnte eine Bindungsaffinität zwischen 160 nM im ELISA (Abb. 4.46-A) und 20 nM in der *bio-layer interferometry* (Abb. 4.46-B) gegen CTLA-4 gemessen werden, die gegenüber des Miniprotein-Monomers um einen Faktor von etwa 20 bis 180 gesteigert werden konnte (Abb. 4.21). Da die vorhandene Octet RED Software kein 4:1-*fitting*-Modell besitzt, wurde die Berechnung der durch *bio-layer interferometry* gemessene Bindungsaffinität mit dem 1:1-*fitting*-Modell durchgeführt. Diese mit dem 1:1-*fitting*-Modell generierten Daten konnten durch den ELISA (Abb. 4.46-A) verifiziert werden.

Die Proteinausbeute der Fc-Fusionsprotein-Expression in HEK293-Zellen war niedrig (Tab. 4.7). Die von M. Sc. Stephan Dickgießer zuvor erzeugten Proteinmengen lagen bei etwa 1,5 bis 2 mg aus 30 mL Kulturmedium. Angelini und Kollegen postulierten, dass in 100 mL Kulturmedium 8 bis 12 mg gereinigtes Fc-Fusionsprotein erwartet werden kann<sup>228</sup>. In Tab. 4.7 fällt auf, dass die produzierbare Proteinmenge davon abhängt, welches Fusionsprotein exprimiert wird. Die Fc-Fusionsproteine mit dem H20C-Linker zeigen eine höhere Proteinausbeute, als die Fusionsproteine mit dem H12-Linker. Außerdem könnte die zweimalige Reinigung der Proteine ebenfalls zu einem Verlust der Ausbeute geführt haben. Das Fc-Fusionsprotein MC-H12-Fc-MC zeigte den deutlichsten Aviditätseffekt (Abb. 4.52-B), welcher in einer Bindungsaffinität von etwa 235 nM gegen CTLA-4 resultierte, was ca. 15-fach besser war als die des Miniprotein-Monomers (Abb. 4.21). Bereits durchgeführte Studien

---

bestätigten, dass zur Generierung von potenten Fc-Fusionsproteinen/-peptiden der wichtigste Parameter die Länge des Linkers ist<sup>228, 229</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Konstrukte mit Linkern gleich oder länger 12 Aminosäuren zu einer Verbesserung der Inhibitions- und Bindungsaktivität führten<sup>228</sup>. Jedoch zeigten die Varianten MC-H20C-Fc und MC-H20C-Fc-MC (Abb. 4.52-C und Abb. 4.52-D) eine geringere Bindungsaffinität als die Varianten TEV-H12-Fc-MC und MC-H12-Fc-MC (Abb. 4.52-A und Abb. 4.52-B). Es ist es möglich, dass ein Aviditätseffekt durch die fehlende optimale CTLA-4-Miniprotein-Bindungswechselwirkung ausblieb. Ein Problem könnte die korrekte Faltung der Miniproteine darstellen. Die Fc-Fusionsproteine MC-H20C-Fc und MC-H20C-Fc-MC tragen im H20C-Linker ebenfalls Cysteine. Die vorhandenen Cysteine der *N*-terminal fusionierten Miniproteine könnten mit den Cysteinen des H20C-Linkers Disulfidbrücken ausbilden, was die geringere Bindungsaffinität der Variante MC-H20C-Fc im Vergleich zu den anderen analysierten Fc-Fusionsproteinen erklären könnte (Abb. 4.52-C). Bei der Variante MC-H20C-Fc-MC könnten die beiden *C*-terminalen Miniproteine korrekt gefaltet sein und somit zur Affinitätsverbesserung geführt haben (Abb. 4.52-D). Diese Verbesserung ist mit der Bindungsaffinität der Variante TEV-H12-Fc-MC vergleichbar, welche nur *C*-terminal die Miniproteine trägt (Abb. 4.52-A).

---

## 4.5 Funktionelle Analyse der isolierten Miniproteinvarianten

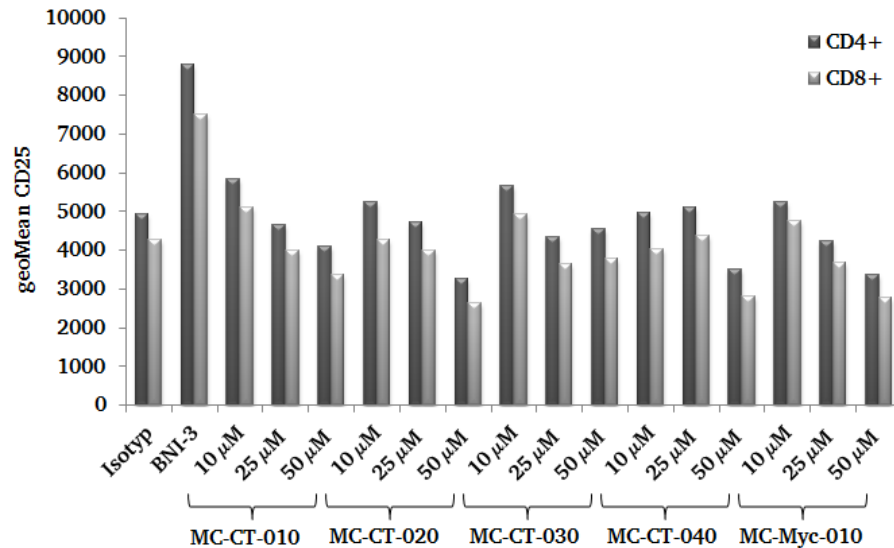
Die in Kapitel 4.2 isolierten und charakterisierten Miniproteine (Tab. 4.5) wurden einem ersten funktionellen Test unterzogen. Hierbei wurde untersucht, ob die Miniproteinvarianten eine immunregulatorische Aktivität aufweisen. Dr. Holger Hoff und Kollegen von der Kooperationsfirma BioNTech AG führten dazu einen funktionellen Assay durch. Hierbei wurde zum einen die Proliferation der T-Zellen *via* Durchflusszytometrie und zum anderen der Einfluss auf die Interferon Gamma (INF- $\gamma$ ) Ausschüttung mittels ELISA analysiert. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) mit 2  $\mu\text{g/mL}$  Phytohämagglutinin (PHA) für 72 h aktiviert. PHA ist ein unspezifisches mitogenes Lektin<sup>230</sup>, was durch Bindung an die CD2-Moleküle zur T-Zell-Aktivierung führt. Nach anschließendem Waschen wurden jeweils  $6 \cdot 10^6$  aktivierte T-Zellen mit 2,5  $\mu\text{M}$  CFSE (Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester) gefärbt und danach mit bestrahlten Raji-Zellen<sup>231</sup> als antigenpräsentierende Zellen (APCs, *antigen-presenting cells*) sowie mit verschiedenen Konzentrationen (10, 25 und 50  $\mu\text{M}$ ) an CTLA-4-bindenden Miniproteinen für 3 Tage kultiviert. Als Kontrollen dienten 1  $\mu\text{M}$  BNI-3 (anti-CTLA-4-Antikörper, mIgG2a, BD Pharmingen) und das Miniprotein MC-Myc-010, welches die genetische Information für das Myc-Epitop anstatt der Sequenz der Inhibitorschleife trägt. Als Kontrolle für BNI-3 diente 1  $\mu\text{M}$  eines Antikörpers mit gleichem Isotyp (mIgG2a, BD Pharmingen). Nach Stimulation der T-Zellen wurden die Zellen mittels FACS und der Überstand *via* ELISA analysiert.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit den Antikörpern anti-CD4-PE, anti-CD8-APC-Cy7 und anti-CD25-APC gefärbt. CD4, CD8 und CD25 dienen als Marker für aktivierte T-Zellen. CD8 befindet sich auf zytotoxischen T-Zellen und CD4 ist ein Marker für T-Helferzellen, welche Zytokine (z.B. Interferone) ausschütten und damit zusätzliche Immunzellen anlocken<sup>232</sup>. CD25 ist die alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors, welcher nur auf aktivierten T-Zellen präsentiert wird<sup>233</sup>. Anhand der Daten wurde der geometrische *mean* bestimmt.

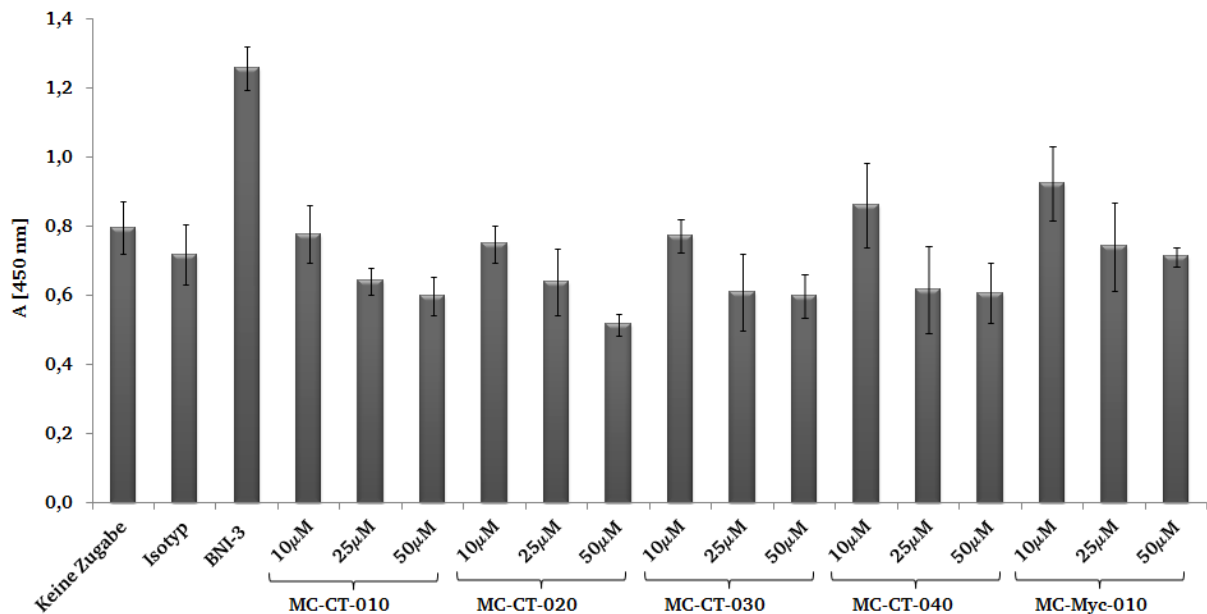
Der ELISA wurde nach der Vorschrift von Schönfeld *et al.*<sup>206</sup> durchgeführt. Hierfür erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit INF- $\gamma$  Antikörper und nach anschließendem *blocking* mit 1 % (w/v) BSA in PBS wurden jeweils 200  $\mu\text{L}$  des Überstands der T-Zellen pro Kavität zugegeben. Der INF- $\gamma$  Standard wurde als Kontrolle mitgeführt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Kavitäten gewaschen und anschließend erfolgte die immunologische Detektion über einen Biotin-konjugierten anti-INF- $\gamma$  Antikörper, Streptavidin-HRP (1:1.000) und TMB-Lösung. Nach 10 min wurde die Entwicklung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im



ELISA-Reader vermessen. Die Ergebnisse der Analyse *via* FACS sind in Abb. 4.53 zu sehen und die Ergebnisse der Analyse *via* ELISA sind in Abb. 4.54 dargestellt.



**Abb. 4.53:** Analyse der T-Zell Proliferation *via* Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der immunregulatorischen Aktivität der verschiedenen Miniproteine. Als Kontrollen dienten BNI-3 und das Miniprotein MC-Myc-010. Als Kontrolle (Isotyp) für BNI-3 diente ein Antikörper des gleichen Isotyps.



**Abb. 4.54:** Analyse der Interferon Gamma (IFN-γ) Produktion *via* ELISA zur Charakterisierung der immunregulatorischen Aktivität der verschiedenen Miniproteine. Als Kontrollen dienten BNI-3 und das Miniprotein MC-Myc-010. Als Kontrolle (Isotyp) für BNI-3 diente ein Antikörper des gleichen Isotyps. Die Analyse erfolgte in einer Dreifachbestimmung, wodurch sich die Fehlerbalken ergeben.

---

Beide Analysen zeigen ein sehr ähnliches Ergebnis. Bei der Kontrolle BNI-3, dem anti-CTLA-4-Antikörper, kommt es zu einer Inhibition von CTLA-4 und somit zu einer vermehrten INF- $\gamma$  Ausschüttung (Abb. 4.54) sowie zu einer verstärkten T-Zell Proliferation (Abb. 4.53). Die Miniproteine zeigen keinen inhibierenden Effekt. Bei höheren Miniprotein-Konzentrationen kam es zu einem gegenteiligen Effekt. Hierbei war eine verringerte T-Zell Proliferation (Abb. 4.53) sowie INF- $\gamma$  Ausschüttung (Abb. 4.54) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.54, keine Zugabe) zu erkennen.

#### **4.5.1 Diskussion der Ergebnisse**

Im letzten Abschnitt wurde untersucht, ob die isolierten Miniproteinvarianten eine immunregulatorische Aktivität aufweisen. Der durchgeführte funktionelle Assay zeigte eine Aktivität der Miniprotein-Monomere auf die Proliferation von T-Zellen und deren Interferon Gamma (INF- $\gamma$ ) Ausschüttung. Bei der Behandlung mit den rekombinant-hergestellten Miniproteinen wurde kein blockierender Effekt wie bei BNI-3 festgestellt<sup>206</sup>, was zu einer vermehrten T-Zell Proliferation führen sollte, da CTLA-4 durch die Blockade nicht an seinen natürlichen Liganden B7 binden und die T-Zell Aktivierung nicht inhibieren kann. Die stattdessen auftretende verringerte T-Zell Proliferation sowie INF- $\gamma$  Ausschüttung wurde auch bei dem Kontroll-Miniprotein MC-Myc-010 festgestellt. Die nicht eindeutigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieser erste durchgeführte Assay keine Aussagekraft besitzt und wiederholt werden muss. Jedoch sollten im nächsten funktionellen Assay die Miniprotein-Oligomere getestet werden, da der generierte Aviditätseffekt eine neue Effizienz<sup>9</sup> und somit ein eindeutigeres Ergebnis mit sich bringen könnte.

---

## 5 Zusammenfassung

---

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von neuartigen Bindemolekülen des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens 4 (CTLA-4) beschrieben. Basierend auf dem Trypsin-Inhibitor MCoTI-II wurde hierfür eine kombinatorische Variantenbibliothek in *S. cerevisiae* erstellt. Die Auswahl der randomisierten Bereiche wurde unter Einbeziehung der Struktur des Cystinknoten-Miniproteins MCoTI-II festgelegt und die Mutationen wurden durch eine Codon-basierte Synthese eingeführt. Die oMCoTI(MCopt)-Bibliothek wurde über homologe Rekombination *via* Transformation in Hefen eingebracht und umfasste  $3 \cdot 10^8$  Varianten. Die Variantenbibliothek wurde über das von Boder und Wittrup entwickelte *yeast display* Verfahren mit dem Aga1p/Aga2p-System auf der Hefeoberfläche präsentiert. Die Funktionalität der Miniprotein-Bibliothek wurde über Selektion auf die Serinprotease Trypsin mittels *fluorescence activated cell sorting* erfolgreich überprüft. Die darauffolgende Durchmusterung auf CTLA-4-Bindemoleküle erfolgte ebenfalls über Durchflusszytometrie. Nach vier Sortierungsrunden konnten eine Hefepopulation, die durch CTLA-4-Ig markiert wurden, isoliert werden und die identifizierten Einzelklone wurden analysiert. Die affinste Miniproteinvariante MC-CT-010 wurde chemisch synthetisiert, oxidativ gefaltet und anschließend biochemisch charakterisiert. Sie zeigte eine apparente Bindungsaffinität von etwa  $3,7 \mu\text{M}$  und ihre Spezifität konnte mittels Immunfluoreszenzmarkierung an CTLA-4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen sowie CTLA-4-präsentierenden EBY100-Zellen *via* Fluoreszenzmikroskop und FACS bestätigt werden. Darüber hinaus konnte ein Aviditätseffekt durch die Oligomerisierung der Miniproteinvariante MC-CT-010 generiert werden. Die Tetramerisierung *via* Avidin zeigte eine spezifische Bindungsaffinität zwischen 20 nM (*bio-layer interferometry*) und 160 nM (ELISA). Außerdem erfolgte die rekombinante Fusion des Miniproteins MC-CT-010 an ein humanes Antikörper-Fc-Fragment. Für die tetramere, affinste Variante MC-H12-Fc-MC, welche N- und C-terminal das Miniprotein trägt, konnte eine spezifische Bindungsaffinität von 235 nM mittels ELISA ermittelt werden. Hier wäre weiterhin zu untersuchen, ob sich die verbesserte Bindungsaffinität der Miniprotein-Fc-Fusionsproteine auch auf CTLA-4-überexprimierenden Zellen über eine Analyse *via* Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometrie bestätigen lässt.

Somit konnten erstmals Miniproteinvarianten gegen CTLA-4 generiert werden, welche dieses spezifisch binden und zur Therapie an beliebige *scaffolds*, wie beispielsweise Antikörper-Fc-Fragmente, fusioniert Anwendung finden könnten. Da CTLA-4 ein immunregulatorischer

---

Rezeptor ist, kann durch dessen Aktivierung oder Inhibition verschiedenste Therapieansätze generiert werden. Ein erster funktioneller Assay wurde von der Kooperationsfirma BioNTech AG durchgeführt. Jedoch ist zukünftig zu prüfen, ob die generierten Miniproteine, auch als Oligomere, eine immunregulatorische Funktion besitzen bzw. die isolierten Varianten über eine weitere, gerichtete Evolution modifiziert und somit verbessert werden können.

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Hariharan, S. et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* **342**, 605-612 (2000).
2. Elvin, J.G., Couston, R.G. & van der Walle, C.F. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* **440**, 83-98 (2013).
3. Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1257-1268 (2005).
4. Zoller, F., Haberkorn, U. & Mier, W. Miniproteins as phage display-scaffolds for clinical applications. *Molecules* **16**, 2467-2485 (2011).
5. Skerra, A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 295-304 (2007).
6. Holliger, P. & Hudson, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126-1136 (2005).
7. Huang, L., Muyldermans, S. & Saerens, D. Nanobodies(R): proficient tools in diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **10**, 777-785 (2010).
8. Mammen, M., Choi, S. & Whitesides, G.M. Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angewandte Chemie* **110**, 2908-2953 (1998).
9. Linsley, P.S. New look at an old costimulator. *Nat Immunol* **6**, 231-232 (2005).
10. Krause, S. et al. Grafting of thrombopoietin-mimetic peptides into cystine knot miniproteins yields high-affinity thrombopoietin antagonists and agonists. *FEBS J* **274**, 86-95 (2007).
11. Jeong, K.J., Mabry, R. & Georgiou, G. Avimers hold their own. *Nat Biotechnol* **23**, 1493-1494 (2005).
12. Skerra, A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J* **275**, 2677-2683 (2008).
13. Stumpp, M.T., Binz, H.K. & Amstutz, P. DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* **13**, 695-701 (2008).
14. Chiche, L. et al. Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Curr Protein Pept Sci* **5**, 341-349 (2004).
15. Kolmar, H. Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 608-614 (2009).
16. Schmoldt, H.U. Neue Enzyminhibitoren und Rezeptoragonisten durch Variation funktionaler Schleifen von Mikroproteinen. (2005).
17. McDonald, N.Q. & Hendrickson, W.A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**, 421-424 (1993).
18. Holland, D.R., Cousens, L.S., Meng, W. & Matthews, B.W. Nerve growth factor in different crystal forms displays structural flexibility and reveals zinc binding sites. *J Mol Biol* **239**, 385-400 (1994).

- 
19. Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggimann, B. & Hosang, M. Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J* **11**, 3921-3926 (1992).
  20. Schlunegger, M.P. & Grutter, M.G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* **358**, 430-434 (1992).
  21. Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J. & Norton, R.S. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci* **3**, 1833-1839 (1994).
  22. Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T. & Waine, C. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* **294**, 1327-1336 (1999).
  23. Daly, N.L. & Craik, D.J. Bioactive cystine knot proteins. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 362-368 (2011).
  24. Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. & Avrutina, O. Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design. *Molecules* **17**, 12533-12552 (2012).
  25. Gelly, J.C. et al. The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. *Nucleic Acids Res* **32**, D156-159 (2004).
  26. Craik, D.J. Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon* **39**, 1809-1813 (2001).
  27. Heitz, A. et al. Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* **40**, 7973-7983 (2001).
  28. Craik, D.J., Cemazar, M., Wang, C.K. & Daly, N.L. The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers* **84**, 250-266 (2006).
  29. Kolmar, H. Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *FEBS J* **275**, 2684-2690 (2008).
  30. Kolmar, H. Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Curr Pharm Des* **17**, 4329-4336 (2011).
  31. Gracy, J. et al. KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res* **36**, D314-319 (2008).
  32. Heitz, A. et al. Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. *BMC Struct Biol* **8**, 54 (2008).
  33. Werle, M., Kolmar, H., Albrecht, R. & Bernkop-Schnurch, A. Characterisation of the barrier caused by lumenally secreted gastro-intestinal proteolytic enzymes for two novel cystine-knot microproteins. *Amino Acids* **35**, 195-200 (2008).
  34. Lahti, J.L., Silverman, A.P. & Cochran, J.R. Interrogating and predicting tolerated sequence diversity in protein folds: application to E. elaterium trypsin inhibitor-II cystine-knot miniprotein. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000499 (2009).
  35. Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., el Hajji, M. & Castro, B. Characterization and 2D NMR study of the stable [9-21, 15-27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II. *Protein Sci* **2**, 165-174 (1993).

- 
36. Avrutina, O. et al. Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II. *Biol Chem* **386**, 1301-1306 (2005).
  37. Quimbar, P. et al. High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J Biol Chem* **288**, 13885-13896 (2013).
  38. Gustafson, K.R., McKee, T.C. & Bokesch, H.R. Anti-HIV cyclotides. *Curr Protein Pept Sci* **5**, 331-340 (2004).
  39. Tam, J.P., Lu, Y.A., Yang, J.L. & Chiu, K.W. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8913-8918 (1999).
  40. Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. & Anderson, M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10614-10619 (2001).
  41. Daly, N.L., Love, S., Alewood, P.F. & Craik, D.J. Chemical synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide kalata B1. *Biochemistry* **38**, 10606-10614 (1999).
  42. Williams, J.A., Day, M. & Heavner, J.E. Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacother* **9**, 1575-1583 (2008).
  43. Hernandez, J.F. et al. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* **39**, 5722-5730 (2000).
  44. Felizmenio-Quimio, M.E., Daly, N.L. & Craik, D.J. Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J Biol Chem* **276**, 22875-22882 (2001).
  45. Reinwarth, M. et al. Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions. *Chembiochem* **14**, 137-146 (2013).
  46. Austin, J., Wang, W., Puttamadappa, S., Shekhtman, A. & Camarero, J.A. Biosynthesis and biological screening of a genetically encoded library based on the cyclotide MCoTI-I. *Chembiochem* **10**, 2663-2670 (2009).
  47. Camarero, J.A., Kimura, R.H., Woo, Y.H., Shekhtman, A. & Cantor, J. Biosynthesis of a fully functional cyclotide inside living bacterial cells. *Chembiochem* **8**, 1363-1366 (2007).
  48. Hofmeyer, T. et al. Protein Production in *Yarrowia lipolytica* Via Fusion to the Secreted Lipase Lip2p. *Mol Biotechnol* (2013).
  49. Werle, M. et al. The potential of cystine-knot microproteins as novel pharmacophoric scaffolds in oral peptide drug delivery. *J Drug Target* **14**, 137-146 (2006).
  50. Werle, M., Kafedjiiski, K., Kolmar, H. & Bernkop-Schnurch, A. Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration. *Int J Pharm* **332**, 72-79 (2007).
  51. Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng* **12**, 797-806 (1999).
  52. Hilpert, K. et al. Design and characterization of a hybrid miniprotein that specifically inhibits porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem* **278**, 24986-24993 (2003).

- 
53. Kimura, R.H. et al. Functional mutation of multiple solvent-exposed loops in the Ecballium elaterium trypsin inhibitor-II cystine knot miniprotein. *PLoS One* **6**, e16112 (2011).
  54. Thongyoo, P., Roque-Rosell, N., Leatherbarrow, R.J. & Tate, E.W. Chemical and biomimetic total syntheses of natural and engineered MCoTI cyclotides. *Org Biomol Chem* **6**, 1462-1470 (2008).
  55. Thongyoo, P., Bonomelli, C., Leatherbarrow, R.J. & Tate, E.W. Potent inhibitors of beta-tryptase and human leukocyte elastase based on the MCoTI-II scaffold. *J Med Chem* **52**, 6197-6200 (2009).
  56. Sommerhoff, C.P. et al. Engineered cystine knot miniproteins as potent inhibitors of human mast cell tryptase beta. *J Mol Biol* **395**, 167-175 (2010).
  57. Kimura, R.H., Cheng, Z., Gambhir, S.S. & Cochran, J.R. Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. *Cancer Res* **69**, 2435-2442 (2009).
  58. Kimura, R.H., Miao, Z., Cheng, Z., Gambhir, S.S. & Cochran, J.R. A Dual-Labeled Knottin Peptide for PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Integrin Expression in Living Subjects. *Bioconjug Chem* (2010).
  59. Jiang, L. et al. Evaluation of a (64)Cu-labeled cystine-knot peptide based on agouti-related protein for PET of tumors expressing alphavbeta3 integrin. *J Nucl Med* **51**, 251-258 (2010).
  60. Jiang, L. et al. <sup>111</sup>In-labeled cystine-knot peptides based on the Agouti-related protein for targeting tumor angiogenesis. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 368075 (2012).
  61. Moore, S.J. et al. Engineered knottin peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14598-14603 (2013).
  62. Kortemme, T. & Baker, D. Computational design of protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 91-97 (2004).
  63. Ulmer, K.M. Protein engineering. *Science* **219**, 666-671 (1983).
  64. Bornscheuer, U.T. & Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 137-143 (2001).
  65. Liu, H.L. & Hsu, J.P. Recent developments in structural proteomics for protein structure determination. *Proteomics* **5**, 2056-2068 (2005).
  66. Siegel, J.B. et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science* **329**, 309-313 (2010).
  67. Cedrone, F., Menez, A. & Quemeneur, E. Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 405-410 (2000).
  68. Arnold, F.H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**, 253-257 (2001).
  69. Tobin, M.B., Gustafsson, C. & Huisman, G.W. Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 421-427 (2000).
  70. Baker, D. An exciting but challenging road ahead for computational enzyme design. *Protein Sci* **19**, 1817-1819 (2010).



- 
71. Jiang, L. et al. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science* **319**, 1387-1391 (2008).
  72. Khoury, G.A. et al. Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. *Protein Sci* **18**, 2125-2138 (2009).
  73. Bellows, M.L. et al. Discovery of entry inhibitors for HIV-1 via a new de novo protein design framework. *Biophys J* **99**, 3445-3453 (2010).
  74. Empting, M. et al. "Triazole bridge": disulfide-bond replacement by ruthenium-catalyzed formation of 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 5207-5211 (2011).
  75. Avrutina, O., Fittler, H., Glotzbach, B., Kolmar, H. & Empting, M. Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redox-stable SFTI-1 variants at near physiological pH. *Org Biomol Chem* **10**, 7753-7762 (2012).
  76. Fittler, H., Avrutina, O., Glotzbach, B., Empting, M. & Kolmar, H. Combinatorial tuning of peptidic drug candidates: high-affinity matriptase inhibitors through incremental structure-guided optimization. *Org Biomol Chem* **11**, 1848-1857 (2013).
  77. Dalby, P.A. Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 500-505 (2003).
  78. Schmidt-Dannert, C. & Arnold, F.H. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol* **17**, 135-136 (1999).
  79. Turner, N.J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol* **21**, 474-478 (2003).
  80. Cirino, P.C., Mayer, K.M. & Umeno, D. Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol Biol* **231**, 3-9 (2003).
  81. Hu, H. et al. DNA shuffling of methionine adenosyltransferase gene leads to improved S-adenosyl-L-methionine production in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **141**, 97-103 (2009).
  82. Barbas, C.F., 3rd, Bain, J.D., Hoekstra, D.M. & Lerner, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4457-4461 (1992).
  83. Yin, C.C. et al. Construction of a fully synthetic human scFv antibody library with CDR3 regions randomized by a split-mix-split method and its application. *J Biochem* **144**, 591-598 (2008).
  84. Van den Brulle, J. et al. A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques* **45**, 340-343 (2008).
  85. Schaaper, R.M. Mechanisms of mutagenesis in the *Escherichia coli* mutator mutD5: role of DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8126-8130 (1988).
  86. Aharoni, A., Amitai, G., Bernath, K., Magdassi, S. & Tawfik, D.S. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chem Biol* **12**, 1281-1289 (2005).
  87. Boersma, Y.L., Droge, M.J. & Quax, W.J. Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J* **274**, 2181-2195 (2007).
  88. Roberts, B.L. et al. Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2429-2433 (1992).

- 
89. Becker, S. et al. Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 5085-5088 (2008).
  90. Zahnd, C. et al. Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *J Biol Chem* **279**, 18870-18877 (2004).
  91. Iffland, A., Gendreizig, S., Tafelmeyer, P. & Johnsson, K. Changing the substrate specificity of cytochrome c peroxidase using directed evolution. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 126-132 (2001).
  92. Doyon, J.B., Pattanayak, V., Meyer, C.B. & Liu, D.R. Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI. *J Am Chem Soc* **128**, 2477-2484 (2006).
  93. Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the Ecballium elaterium trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J Biol Chem* **274**, 21037-21043 (1999).
  94. Souriau, C., Chiche, L., Irving, R. & Hudson, P. New binding specificities derived from Min-23, a small cystine-stabilized peptidic scaffold. *Biochemistry* **44**, 7143-7155 (2005).
  95. Hertveldt, K., Belien, T. & Volckaert, G. General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **502**, 321-339 (2009).
  96. Daugherty, P.S. Protein engineering with bacterial display. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 474-480 (2007).
  97. Lofblom, J. Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol J* **6**, 1115-1129 (2011).
  98. Boder, E.T. & Wittrup, K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* **15**, 553-557 (1997).
  99. Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R. & Pluckthun, A. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14130-14135 (1998).
  100. Rothe, A., Hosse, R.J. & Power, B.E. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 177-187 (2006).
  101. Valencia, C.A., Cotten, S.W., Dong, B. & Liu, R. mRNA-display-based selections for proteins with desired functions: a protease-substrate case study. *Biotechnol Prog* **24**, 561-569 (2008).
  102. Lamla, T. & Erdmann, V.A. In vitro selection of other proteins than antibodies by means of ribosome display. *FEBS Lett* **502**, 35-40 (2001).
  103. Leemhuis, H., Stein, V., Griffiths, A.D. & Hollfelder, F. New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 472-478 (2005).
  104. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
  105. Krebber, A. et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* **201**, 35-55 (1997).

- 
106. Lowman, H.B. Phage display of peptide libraries on protein scaffolds. *Methods Mol Biol* **87**, 249-264 (1998).
  107. Charbit, A., Molla, A., Saurin, W. & Hofnung, M. Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria. *Gene* **70**, 181-189 (1988).
  108. Agterberg, M., Adriaanse, H. & Tommassen, J. Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of Escherichia coli K-12. *Gene* **59**, 145-150 (1987).
  109. Francisco, J.A., Earhart, C.F. & Georgiou, G. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2713-2717 (1992).
  110. Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. & Kolmar, H. Display of passenger proteins on the surface of Escherichia coli K-12 by the enterohemorrhagic E. coli intimin EaeA. *J Bacteriol* **183**, 7273-7284 (2001).
  111. Adams, T.M., Wentzel, A. & Kolmar, H. Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation. *J Bacteriol* **187**, 522-533 (2005).
  112. Chao, G. et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc* **1**, 755-768 (2006).
  113. Kieke, M.C., Cho, B.K., Boder, E.T., Kranz, D.M. & Wittrup, K.D. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* **10**, 1303-1310 (1997).
  114. Graff, C.P., Chester, K., Begent, R. & Wittrup, K.D. Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Eng Des Sel* **17**, 293-304 (2004).
  115. Colby, D.W. et al. Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. *J Mol Biol* **342**, 901-912 (2004).
  116. Razai, A. et al. Molecular evolution of antibody affinity for sensitive detection of botulinum neurotoxin type A. *J Mol Biol* **351**, 158-169 (2005).
  117. Boder, E.T., Midelfort, K.S. & Wittrup, K.D. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10701-10705 (2000).
  118. Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R. & Tanner, W. Mating type-specific cell-cell recognition of Saccharomyces cerevisiae: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13**, 4737-4744 (1994).
  119. Cappellaro, C. et al. Saccharomyces cerevisiae a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J* **10**, 4081-4088 (1991).
  120. Shen, Z.M. et al. Delineation of functional regions within the subunits of the Saccharomyces cerevisiae cell adhesion molecule a-agglutinin. *J Biol Chem* **276**, 15768-15775 (2001).
  121. Aylon, Y. & Kupiec, M. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* **566**, 231-248 (2004).
  122. Benatuil, L., Perez, J.M., Belk, J. & Hsieh, C.M. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng Des Sel* **23**, 155-159 (2010).

- 
123. Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J. & Botstein, D. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**, 201-216 (1987).
  124. Wang, Z., Mathias, A., Stavrou, S. & Neville, D.M., Jr. A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein Eng Des Sel* **18**, 337-343 (2005).
  125. Zhao, Q., Zhu, Z. & Dimitrov, D.S. Yeast display of engineered antibody domains. *Methods Mol Biol* **899**, 73-84 (2012).
  126. Gai, S.A. & Wittrup, K.D. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 467-473 (2007).
  127. Gera, N., Hussain, M. & Rao, B.M. Protein selection using yeast surface display. *Methods* **60**, 15-26 (2013).
  128. Gardner, B.M. & Walter, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891-1894 (2011).
  129. Rao, B.M., Driver, I., Lauffenburger, D.A. & Wittrup, K.D. High-affinity CD25-binding IL-2 mutants potently stimulate persistent T cell growth. *Biochemistry* **44**, 10696-10701 (2005).
  130. Holler, P.D. et al. In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5387-5392 (2000).
  131. Kim, Y.S., Bhandari, R., Cochran, J.R., Kuriyan, J. & Wittrup, K.D. Directed evolution of the epidermal growth factor receptor extracellular domain for expression in yeast. *Proteins* **62**, 1026-1035 (2006).
  132. Pavoov, T.V., Cho, Y.K. & Shusta, E.V. Development of GFP-based biosensors possessing the binding properties of antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11895-11900 (2009).
  133. Kimura, R.H., Levin, A.M., Cochran, F.V. & Cochran, J.R. Engineered cystine knot peptides that bind  $\alpha\text{v}\beta 3$ ,  $\alpha\text{v}\beta 5$ , and  $\alpha 5\beta 1$  integrins with low-nanomolar affinity. *Proteins* **77**, 359-369 (2009).
  134. Glotzbach, B. et al. Combinatorial optimization of cystine-knot peptides towards high-affinity inhibitors of human matriptase-1. *PLoS One* **8**, e76956 (2013).
  135. Silverman, A.P., Levin, A.M., Lahti, J.L. & Cochran, J.R. Engineered cystine-knot peptides that bind  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin with antibody-like affinities. *J Mol Biol* **385**, 1064-1075 (2009).
  136. de Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* **6**, 24-37 (2006).
  137. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145 (2001).
  138. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
  139. Stuart, L.M. & Ezekowitz, R.A. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**, 539-550 (2005).
  140. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).

- 
141. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. Cellular and molecular immunology, Edn. 6th. (Saunders/Elsevier, Philadelphia; 2010).
  142. Sharpe, A.H. & Abbas, A.K. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* **355**, 973-975 (2006).
  143. Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. & Kuchroo, V.K. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* **18**, 389-418 (1998).
  144. Oble, D.A., Loewe, R., Yu, P. & Mihm, M.C., Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* **9**, 3 (2009).
  145. Le, N.T. & Chao, N. Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant* **39**, 1-9 (2007).
  146. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506-511 (2003).
  147. Kristiansen, O.P., Larsen, Z.M. & Pociot, F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* **1**, 170-184 (2000).
  148. Vaidya, B. et al. An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 180-183 (2002).
  149. Zalloua, P.A. et al. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum Immunol* **65**, 719-724 (2004).
  150. Donner, H. et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4130-4132 (1997).
  151. Chistiakov, D.A. & Turakulov, R.I. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol* **31**, 21-36 (2003).
  152. Blomhoff, A. et al. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3474-3476 (2004).
  153. Ruderman, E.M. & Pope, R.M. The evolving clinical profile of abatacept (CTLA4-Ig): a novel co-stimulatory modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **7 Suppl 2**, S21-25 (2005).
  154. Weisman, M.H. et al. Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **33**, 2162-2166 (2006).
  155. Schwartz, J.C., Zhang, X., Fedorov, A.A., Nathenson, S.G. & Almo, S.C. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* **410**, 604-608 (2001).
  156. Linsley, P.S. et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**, 561-569 (1991).
  157. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**, 459-465 (1995).
  158. van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S.J. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* **185**, 393-403 (1997).
  159. Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G. & Allison, J.P. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* **19**, 565-594 (2001).

- 
160. Lee, K.M. et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**, 2263-2266 (1998).
  161. Chen, W., Jin, W. & Wahl, S.M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med* **188**, 1849-1857 (1998).
  162. Weber, J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *Oncologist* **12**, 864-872 (2007).
  163. Hodi, F.S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723 (2010).
  164. Ribas, A. et al. Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist* **12**, 873-883 (2007).
  165. Bristol-Myers YERVOY® Ipilimumab - Basisinformationen für Partner im Gesundheitswesen. (2011).
  166. Robert, C. & Ghiringhelli, F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* **14**, 848-861 (2009).
  167. Chmielowski, B. Ipilimumab: A First-in-Class T-Cell Potentiator for Metastatic Melanoma. *J Skin Cancer* **2013**, 423829 (2013).
  168. Peggs, K.S., Quezada, S.A., Korman, A.J. & Allison, J.P. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **18**, 206-213 (2006).
  169. Mokyr, M.B., Kalinichenko, T., Gorelik, L. & Bluestone, J.A. Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. *Cancer Res* **58**, 5301-5304 (1998).
  170. van Elsas, A., Hurwitz, A.A. & Allison, J.P. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* **190**, 355-366 (1999).
  171. Studier, F.W. & Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130 (1986).
  172. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 523-533 (2003).
  173. Phan, J. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *J Biol Chem* **277**, 50564-50572 (2002).
  174. Maresso, A.W. & Schneewind, O. Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol Rev* **60**, 128-141 (2008).
  175. Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145 (1988).
  176. Sharp, P.A., Sugden, B. & Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-3063 (1973).



- 
177. Huang, Q. & Fu, W.L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* **43**, 841-842 (2005).
  178. Roberts, R.J. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**, 1805-1812 (2003).
  179. Saiki, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
  180. Saiki, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
  181. Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350 (1987).
  182. Kitamura, K. & Yamamoto, Y. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Arch Biochem Biophys* **153**, 403-406 (1972).
  183. Maass, A. et al. A general strategy for antibody library screening via conversion of transient target binding into permanent reporter deposition. *Protein Eng Des Sel* **27**, 41-47 (2014).
  184. Hermanson, G.T. Bioconjugate techniques. (Academic Press, San Diego; 1996).
  185. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971).
  186. Childs, R.E. & Bardsley, W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J* **145**, 93-103 (1975).
  187. Porstmann, T. & Kiessig, S.T. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* **150**, 5-21 (1992).
  188. Hiner, A.N. et al. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. *Arch Biochem Biophys* **392**, 295-302 (2001).
  189. Sagers, R.D. An efficient, easily constructed cell homogenizing press. *Appl Microbiol* **10**, 37-39 (1962).
  190. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
  191. Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta* **107**, 144-145 (1965).
  192. Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-2423 (1995).
  193. Tambourgi, D.V., Ogden, G.B., Hall, B.F., da Silva, W.D. & Kipnis, T.L. Biotinylation a fast and reproducible method for labelling Trypanosoma cruzi cell surface proteins. *Trop Med Parasitol* **44**, 91-94 (1993).
  194. Green, N.M. & Toms, E.J. Purification and crystallization of avidin. *Biochem J* **118**, 67-70 (1970).

- 
195. Mojsov, S. & Merrifield, R.B. An improved synthesis of crystalline mammalian glucagon. *Eur J Biochem* **145**, 601-605 (1984).
  196. Barany, G. & Merrifield, R.B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J Am Chem Soc* **99**, 7363-7365 (1977).
  197. Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, C.B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 636-643 (1968).
  198. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599 (1975).
  199. Porath, J. High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. *J Chromatogr* **443**, 3-11 (1988).
  200. Xu, X. et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* **29**, 735-741 (2011).
  201. Anson, M.L. & Mirsky, A.E. The Estimation of Trypsin with Hemoglobin. *J Gen Physiol* **17**, 151-157 (1933).
  202. Modesti, M. & Kanaar, R. Homologous recombination: from model organisms to human disease. *Genome Biol* **2**, REVIEWS1014 (2001).
  203. Robert, F. et al. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* **19**, 3234-3243 (2001).
  204. Schirrmann, T., Meyer, T., Schutte, M., Frenzel, A. & Hust, M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* **16**, 412-426 (2011).
  205. Steiner, D., Forrer, P. & Pluckthun, A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol* **382**, 1211-1227 (2008).
  206. Schonfeld, D. et al. An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8198-8203 (2009).
  207. Moore, S.J. & Cochran, J.R. Engineering knottins as novel binding agents. *Methods Enzymol* **503**, 223-251 (2012).
  208. Gould, A., Ji, Y., Aboye, T.L. & Camarero, J.A. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. *Curr Pharm Des* **17**, 4294-4307 (2011).
  209. Beck, A. & Reichert, J.M. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs* **3**, 415-416 (2011).
  210. Mardis, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* **24**, 133-141 (2008).
  211. Cooper, G.M. The cell : a molecular approach, Edn. 2nd. (ASM Press ; Sinauer Associates, Washington, D.C. Sunderland, Mass.; 2000).
  212. Wooldridge, L. et al. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology* **126**, 147-164 (2009).



- 
213. Laugel, B. et al. Design of soluble recombinant T cell receptors for antigen targeting and T cell inhibition. *J Biol Chem* **280**, 1882-1892 (2005).
  214. Altman, J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96 (1996).
  215. Silverman, J. et al. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1556-1561 (2005).
  216. Song, B. Affilin® binding proteins selected against a class B GPCR ectodomain. (2012).
  217. Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D. & Castro, B. Folding of the squash trypsin inhibitor EETI II. Evidence of native and non-native local structural preferences in a linear analogue. *Eur J Biochem* **233**, 837-846 (1995).
  218. Zahnd, C., Sarkar, C.A. & Pluckthun, A. Computational analysis of off-rate selection experiments to optimize affinity maturation by directed evolution. *Protein Eng Des Sel* **23**, 175-184 (2010).
  219. Krah, S. Erstellen und Durchmustern kombinatorischer Peptidbibliotheken auf der Basis janusköpfiger Miniproteine. (2012).
  220. Bayer, E.A. & Wilchek, M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal* **26**, 1-45 (1980).
  221. Green, N.M. Avidin. 1. The Use of (14-C)Biotin for Kinetic Studies and for Assay. *Biochem J* **89**, 585-591 (1963).
  222. Diamandis, E.P. & Christopoulos, T.K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* **37**, 625-636 (1991).
  223. Hiller, Y., Gershoni, J.M., Bayer, E.A. & Wilchek, M. Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochem J* **248**, 167-171 (1987).
  224. Paganelli, G. et al. Radioimmunoguided surgery using iodine-125-labeled biotinylated monoclonal antibodies and cold avidin. *J Nucl Med* **35**, 1970-1975 (1994).
  225. Kobayashi, H. et al. Improved clearance of radiolabeled biotinylated monoclonal antibody following the infusion of avidin as a "chase" without decreased accumulation in the target tumor. *J Nucl Med* **35**, 1677-1684 (1994).
  226. Huang, C. Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 692-699 (2009).
  227. Kontermann, R. Therapeutic proteins : strategies to modulate their plasma half-lives. (Wiley-Blackwell, Weinheim; 2012).
  228. Angelini, A. et al. Chemical macrocyclization of peptides fused to antibody Fc fragments. *Bioconjug Chem* **23**, 1856-1863 (2012).
  229. Mezo, A.R. et al. Atrial natriuretic peptide-Fc, ANP-Fc, fusion proteins: semisynthesis, in vitro activity and pharmacokinetics in rats. *Bioconjug Chem* **23**, 518-526 (2012).
  230. Nowell, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* **20**, 462-466 (1960).

- 
231. Karpova, M.B. et al. Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol* **28**, 605-617 (2006).
232. Ellmeier, W., Sawada, S. & Littman, D.R. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* **17**, 523-554 (1999).
233. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
°C	Grad
μ	mikro
α	anti
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Äq	Äquivalent(e)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CM	Chloramphenicol
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
d. h.	das heißt
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure

---

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double-stranded</i> DNA, Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
GOI	<i>gen of interest</i>
GOX	Glucose-Oxidase
Gu-HCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde(n)
HA	Hemagglutinin
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molekulargewicht (in g/mol)
MCoTI-II	<i>Momordica cochinchinensis</i> Trypsininhibitor II
min	Minute(n)
MTBE	Methyl-tert-butylether
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung



PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (-Puffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s	Sekunde(n)
S-APC	Streptavidin-Allophycocyanin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
ssDNA	<i>single-stranded</i> DNA, Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA(-Puffer)
TE	Tris-EDTA(-Puffer)
Tet	Tetracyclin
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
YPG	<i>Yeast Peptone Galactose</i>
z. B.	zum Beispiel

---

## 8 Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich allen Personen Danke sagen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die angenehme Betreuung, die wissenschaftlichen sowie anregenden Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Prof. Dr. Siegfried Neumann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Diese Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung und die hervorragende Kooperation mit der BioNTech AG ermöglicht. Mein Dank gilt deshalb besonders Prof. Dr. Ugur Sahin, Dr. Hans-Ulrich Schmoldt, Dr. Martin Daneschdar, Dr. Joycelyn Wüsthube-Lausch und Dr. Markus Fiedler. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Olga Avrutina für die Unterstützung bei Publikationen und Barbara Diestelmann für die kompetente Hilfe in bürokratischen Angelegenheiten sowie die regelmäßigen Gespräche über unsere geliebten Miezkatzen bedanken. Reini, Hörnchen, Heiko und Christel danke ich für die chemische Unterstützung und die anregenden Diskussionen über die fantastische Welt der Chemie. Stephan (Dicki) danke ich für die Pflege der CHO-K1-Zellen und die tolle Zusammenarbeit im Projekt "Miniproteine als Fc-Fusion". Simon möchte ich für die schöne Zeit in seiner Bachelorarbeit und sein entgegengebrachtes Vertrauen danken.

Ich danke der gesamten AG Kolmar, den schon Ausgeflogenen und noch Verbliebenen, für den Spaß, das angenehme Arbeitsklima, die Grillabende, die gemütlichen Weihnachtsfeiern, die "Klassenfahrten" und sonstige Aktivitäten, wie das Dancen zu Trash-Party-Musik, sowie die privaten Gespräche und wissenschaftlichen Hilfestellungen.

Meiner Schnini, Becki, Timi und Sebastian danke ich für ihre Freundschaft, ihre immerwährende Unterstützung und die schönen gemeinsamen Stunden. Ohne euch wären diese Jahre nur halb so schön gewesen!

Ich danke meinen Eltern, Olaf und Simone, für ihre stetige kompromisslose Unterstützung und den geistigen Beistand während meiner Doktorarbeit. Ich danke euch, dass ihr immer für mich da seid!

Schließlich danke ich meinen Mann Alex von ganzem Herzen. Ich danke dir, dass du mit mir diesen oftmals steinigen Weg gemeinsam gegangen bist, mir immer zur Seite stehst und niemals an mir zweifelst. Ohne dich wäre das Alles nicht möglich gewesen♥!

---

---

## **9 Erklärungen**

---

### **9.1 Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Darmstadt, den 18.03.2014 \_\_\_\_\_

### **9.2 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den 18.03.2014 \_\_\_\_\_

---

## 10 Publikationen

---

Fabritz, S.\*, Maaß, F.\* *et al.* A sensitive method for rapid detection of alkyl halides and dehalogenase activity using a multistep enzyme assay. *AMB Express* **2**, 51 (2012). \*Equal contributors

Maaß, A.\*, Heiseler, T.\*, Maaß, F. *et al.* A general strategy for antibody library screening via conversion of transient target binding into permanent reporter deposition. *Protein Eng Des Sel.* **27**, 41-47 (2014). \*Equal contributors



---

## 11 Lebenslauf

---

Name: Franziska Maaß

Geburtsdatum: 28.06.1986

Geburtsort: Dresden

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

06/2005 **Abitur** am Gymnasium der Friedrich-Ebert-Schule, Pfungstadt

10/2005 – 08/2010 **Studium der Biologie** an der Technischen Universität Darmstadt

Hauptvertiefungen: Biochemie, Mikrobiologie,  
Zell- und Entwicklungsbiologie

Abschluss: Diplom (1,68)

12/2009 – 08/2010 **Diplomarbeit** am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar

**Thema der Diplomarbeit:** "*In Vivo* Immobilisierung von Enzymen und deren Einsatz für gekoppelte Enzymreaktionen von biotechnologischer Relevanz"

10/2010 – 04/2014 **Promotion** am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar

Kooperation und Förderung durch die BioNTech AG, Mainz

**Thema der Promotion:** "*Protein Engineering* an Cystinknoten-Miniproteinen: Generierung von immunregulatorischen Varianten mit optimierten Bindungseigenschaften und Gerüststrukturen"

Darmstadt, den 18.03.2014 \_\_\_\_\_